

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
der Universitätsmedizin Rostock

Ehemaliger Direktor: Professor em. Dr. med. Peter Schuff-Werner

**In vitro Glykolysehemmung durch Citrat/Natriumfluorid:
Wie die Lösung eines präanalytischen Problems zu einem postanalytischen
Problem führen kann
- Eine retrospektive Feldstudie -**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Saskia Sharma, geb. Moritz
geb. am 07.06.1987 in Berlin
aus Wolfsburg

Rostock, 2020



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 4.0 International Lizenz.

- Dekan:** Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger
- 1. Gutachter:** Prof. em. Dr. med. Peter Schuff-Werner, Ehemaliger Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Rostock
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. S. Baltrusch, Stellvertretende Direktorin des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universitätsmedizin Rostock
- 3. Gutachter:** Prof. Dr. med. Matthias Nauck, Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald

Datum der Einreichung: 27. Januar 2020

Datum der Verteidigung: 16. Dezember 2020

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Medizingeschichtliche Aspekte	1
1.1.2 Definition und Klassifikation	2
1.1.3 Epidemiologie	3
1.1.4 Komplikationen	4
1.1.5 Diagnosekriterien	4
1.2 Klinisch- chemische Untersuchungen der Blutglukose	5
1.2.1 Chemische Bestimmungsmethoden	6
1.2.2 Probenmaterialien für die Blutglukosebestimmung	6
1.3 Präanalytik, Analytik und Postanalytik	7
1.3.1 Glykolyse	8
1.3.2 Stabilisierung der Glukose in vitro	11
1.3.2.1 Chemische Glykolyseinhibitoren	11
1.3.2.2 Physikalische Methoden der Glykolyseinhibition	12
1.4 Glykiertes Hämoglobin A1c	14
2 FRAGESTELLUNG	16
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 Studiendesign	17
3.2 Beschreibung der Patientenkollektive	17
3.2.1 Patientengesamtkollektiv	17
3.2.2 Verlaufsstudienkollektiv	19
3.3 Datenerfassung und Bearbeitung	20

3.4	Methoden der statistischen Datenauswertung und grafischen Darstellung	21
3.5	Blutentnahme	22
3.6	Messmethoden und Messgeräte	23
3.7	Referenzwerte	24
3.7.1	Nüchternplasmaglukose	24
3.7.2	HbA1c	25
4	ERGEBNISSE	26
4.1	Analyse der Nüchternglukosekonzentrationen von 53.046 Patienten	26
4.1.1	Vergleich der Nüchternplasmaglukosewerte des Patientengesamtkollektivs vor (2014) und nach (2015) der Umstellung auf mit Citrat versetzte Entnahmebehälter	27
4.2	Vergleich der Nüchternglukosekonzentrationen und der HbA1c-Werte von 201 Patienten vor und nach Umstellung der Entnahmesysteme für die Blutzuckermessung	31
4.2.1	Vergleich der Nüchternglukosewerte	31
4.2.2	Vergleich der HbA1c-Werte	35
4.2.3	Statistische Bewertung der Glukose- und HbA1c-Wertelageveränderung in den Jahren 2014 und 2015 des Verlaufsstudienkollektivs	38
4.3	Vergleichende klinische Bewertung der diabetischen Stoffwechsellage von 201 Patienten auf der Grundlage veränderter Nüchternglukosewerte nach Einführung neuer Blutentnahmesysteme mit optimierter Glykolyseinhibition	41
4.3.1	Vergleichende Bewertung der diabetischen Stoffwechsellage anhand der Glukosewerte für die Vergleichsjahre 2014 und 2015	41
4.3.2	Vergleichende Bewertung der diabetischen Stoffwechsellage anhand der HbA1c-Werte für die Vergleichsjahre 2014 und 2015	43
4.3.3	Vergleichende Stoffwechselbewertung der auf Basis der Glukose- und HbA1c-Werte in den Jahren 2014 und 2015 analysierten 201 Patienten	45
4.3.4	Exemplarischer Verlauf der Nüchternglukose- und HbA1c-Werte vor (2014) und nach Umstellung (2015) der Glukoseentnahmesysteme mit veränderter Stoffwechselbewertung	46
5	DISKUSSION	48
6	ZUSAMMENFASSUNG	64
7	LITERATURVERZEICHNIS	67

Thesen	LXXVIII
Selbstständigkeitserklärung.....	LXXX
Danksagung	LXXXI
Anhang	LXXXII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Reaktionsschritte der Glykolyse.....	10
Abb. 2:	Altersverteilung des Gesamtkollektivs in 10-Jahres Intervallen....	18
Abb. 3:	Geschlechterverteilung des Gesamtkollektivs.....	18
Abb. 4:	Altersverteilung des Verlaufsstudienkollektivs in 10-Jahres Intervallen	20
Abb. 5:	Geschlechterverteilung des Verlaufsstudienkollektivs.....	20
Abb. 6:	Schematische Darstellung eines Boxplots in SPSS.....	22
Abb. 7:	Absolute Häufigkeitsverteilung der Nüchternplasmaglukosewerte in 0,5-mmol/l-Intervallen in den Jahren 2014 und 2015 für das Gesamtkollektiv.....	28
Abb. 8:	Relative Häufigkeitsverteilung der Nüchternplasmaglukosewerte der untersuchten Gesamtpopulation in mmol/l für die Jahre 2014 und 2015, dargestellt als sogenannte Kerndichteschätzung.....	29
Abb. 9:	Absolute Häufigkeitsverteilung der Differenzen der patientenbezogenen Nüchternglukosejahresmittelwerte des Gesamtkollektivs aus 2015 und 2014 in 10-Prozent-Intervallen.....	30
Abb. 10:	Nüchternglukosewerte des Verlaufsstudienkollektivs von Januar 2014 bis Dezember 2015.....	32
Abb. 11:	Relative Häufigkeitsverteilung der Nüchternplasmaglukosewerte der Patienten des untersuchten Verlaufsstudienkollektivs in mmol/l für die Jahre 2014 und 2015, dargestellt als sogenannte Kerndichteschätzung.....	33
Abb. 12:	Exemplarischer Nüchternglukoseverlauf eines anonymisierten Patienten in den Jahren 2014 und 2015 mit farbiger Hinterlegung der Stoffwechselbewertung.....	34
Abb. 13:	HbA1c-Werte des Verlaufsstudienkollektivs von Januar 2014 bis Dezember 2015.....	36
Abb. 14:	Relative Häufigkeitsverteilung der HbA1c-Werte der Patienten des untersuchten Verlaufsstudienkollektivs in Prozent für die Jahre 2014 und 2015, dargestellt als sogenannte Kerndichteschätzung.....	37
Abb. 15:	Vergleich der patientenbezogenen Nüchternglukose-Jahresmittelwerte in mmol/l für die Jahre 2014 und 2015.....	38
Abb. 16:	Vergleich der HbA1c-Jahresmittelwerte des Verlaufsstudienkollektivs in den Jahren 2014 und 2015.....	39

Abb. 17a-c:	Kreisdiagramme zur Darstellung der Stoffwechsellage des Verlaufsstudienkollektivs anhand der Nüchternplasmaglukosekonzentrationen nach den aktuellen Kriterien der Deutschen Diabetes Gesellschaft.....	42
Abb. 18a-c:	Kreisdiagramme zur Darstellung der Stoffwechsellage des Verlaufsstudienkollektivs anhand der HbA1c-Wertelagen unter Berücksichtigung der aktuellen Kriterien der Deutschen Diabetes Gesellschaft	44
Abb. 19:	Nüchternglukose- und HbA1c-Verlauf eines anonymisierten Patienten mit farbiger Hinterlegung der Stoffwechselbewertung.	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle I:	Natriumfluorid/Citrat-haltige Blutentnahmeröhrchen verschiedener Hersteller...	14
Tabelle II:	Diagnosekriterien zur Beurteilung der diabetischen Stoffwechsellage anhand der Nüchternplasmaglukosekonzentration gemäß den aktuellen Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft.....	24
Tabelle III:	Diagnosekriterien zur Beurteilung der diabetischen Stoffwechsellage anhand der HbA1c-Konzentration gemäß den aktuellen Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft.....	25
Tabelle IV:	Absolute und relative Anzahl an Glukosemessungen in den Jahren 2014 und 2015 bezogen auf das Gesamtkollektiv.....	26
Tabelle V:	Statistische Kenngrößen für die Nüchternglukosekonzentrationen [mmol/l] des Patientengesamtkollektivs in den Jahren 2014 und 2015.....	27
Tabelle VI:	Statistische Kenngrößen für die Nüchternglukosekonzentrationen [mmol/l] des Verlaufsstudienkollektivs in den Jahren 2014 und 2015.....	31
Tabelle VII:	Statistische Kenngrößen für die HbA1c-Werte [%] des Verlaufsstudienkollektivs in den Jahren 2014 und 2015.....	35
Tabelle VIII:	Bewertung der Stoffwechsellage der Studienteilnehmer (n=201) im Jahr vor (2014) und nach (2015) der Umstellung der Blutzuckerentnahmesysteme auf Basis von Nüchternglukose- und der HbA1c-Werten.....	45
Tabelle XI:	Prozentuale Veränderung der Bewertung der Stoffwechsellage der Studienteilnehmer (n=201) nach der Umstellung der Blutzuckerentnahmesysteme (2015) auf Basis von Nüchternglukose- und der HbA1c-Werten.....	46

Abkürzungsverzeichnis

AACC	American Association for Clinical Chemistry
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosindiphosphat
AGDT	Arbeitsgemeinschaft Diabetologische Technologie
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAkKS	Deutsche Akkreditierungsstelle
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GAD65A	glutamic acid decarboxylase 65 antibodies (= Glutamatdecarboxylase-Autoantikörper)
HAPO	Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome
HbA1c	glykosyliertes Hämoglobin A1c
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (= Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IAA	Insulin autoantibodies (= Insulinautoantikörper)
IA-2A	Islet antigen-2 antibodies (= Autoantikörper gegen die Protein-Tyrosin-Phosphatase IA 2, ein Inselzell-Antigen)
ICA	Islet cell antibodies (= Inselzellantikörper)
IDF	International Diabetes Federation
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IGT	Impaired Glucose Tolerance (= gestörte Glukosetoleranz)
K ₂ -EDTA	Dikaliumethylendiamintetraacetat
l	Liter
LADA	latent autoimmune diabetes in adults

LDH	Lactatdehydrogenase
Mg ²⁺	Magnesium
mmol	Millimol
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
Na ₂ -EDTA	Dinatriummethylenediamintetraacetat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAD ⁺	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NADH/H ⁺	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NaF	Natriumfluorid
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
POCT	Point-of-Care-Testing, (patientennahe Labordiagnostik)
SPSS	Superior Performing Software Systems
WHO	World Health Organization

1 EINLEITUNG

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Medizingeschichtliche Aspekte

Der Begriff „Diabetes“ stammt aus dem 2. Jahrhundert vor Christus und ist heute auf der ganzen Welt gebräuchlich. Die ersten Krankheitsschilderungen präsentiert der antike Arzt Aretaios von Kappadozien (um 81-138 n. Chr.). Seine Krankheitsbeschreibung beginnt mit der Feststellung: *„Der Diabetes ist eine rätselvolle Krankheit. Das Leiden besteht aus einer Verflüssigung des Fleisches und der Knochen zu Urin“* [1]. Mit Beginn der Neuzeit bewertet Paracelsus (1493-1541) die Diabeteserkrankung als eine Stoffwechselerkrankung im Blut. Neu gewonnene Kenntnisse aus der Biochemie ermöglichen den Nachweis einer schädlichen „Salzbildung“ im Blut, welche den Durst des Diabetikers verursachen soll [2, 3]. Die erste Geschmacksprobe des diabetischen Harns und somit auch der erste diagnostische Schritt, wird dem Engländer Thomas Willis 1674 zugesprochen. Er beschreibt den Urin als honigsüß (mellitus), sodass der Diabetes fortan seine Zusatzbezeichnung erhält [4]. Im Jahr 1776 entwickelt der englische Arzt Matthew Dobson eine Methode zum Eindämpfen von Zucker und wird somit zum Entdecker des Blutzuckers [5]. Die Anatomie und Histologie der Pankreasinselzellen beschreibt Paul Langerhans (1847-1888) 1869 in seiner Dissertation. Nach seinem Tod erhalten die Zellanhäufungen zu Ehren des Entdeckers den Namen „Ilots de Langerhans“, „Langerhanssche Inseln“ [6]. Einen wichtigen Meilenstein setzen Minkowski und Mering im Jahr 1889. Sie führen eine totale Pankreatektomie bei einem Hund durch, was zur Entstehung eines pankreopriven Diabetes mellitus führt. Diese wissenschaftliche Erkenntnis, dass das Pankreas die entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung des Glukosestoffwechsels spielt, legt den Grundstein für weitere Forschungen [7, 8]. Der Durchbruch in der Diabetesforschung erfolgte 1921 mit der Isolierung des Insulins aus dem Pankreas durch Banting, Best und Collip und dessen erster erfolgreicher therapeutischer Anwendung 1922, bei dem 14-jährigen Leonard Thompson [9]. In den darauffolgenden Jahren entstehen professionelle Fachgesellschaften, unter anderem die deutsche- und amerikanische Diabetesgesellschaft, die sich mit den aktuellen Ergebnissen der Diabetesforschung beschäftigen und erste Behandlungsleitlinien entwickeln [10–12].

1.1.2 Definition und Klassifikation

Der Diabetes mellitus ist eine chronische fortschreitende Stoffwechselerkrankung, bei der eine Regulationsstörung des Blutzuckerspiegels vorliegt. Führendes Merkmal ist eine andauernde Hyperglykämie als Folge einer gestörten Insulinausschüttung und/oder einer gestörten Insulinwirkung [13]. Symptome der Hyperglykämie umfassen Polyurie, Polydipsie, anders nicht erklärbarer Gewichtsverlust, Sehstörungen und Infektanfälligkeit. Die Ketoazidose und das nicht-ketoazidotische hyperosmolare Syndrom sind Ausdruck eines vollständig entgleisten Blutzuckers mit Gefahr eines diabetischen Komas [14].

Man unterscheidet nach der Ätiologie vier Typen des Diabetes mellitus:

1) Bei dem insulinabhängigen Typ-1-Diabetes kommt es zu einer fortschreitenden Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas, wodurch ein absoluter Insulinmangel resultiert. Der Typ-1-Diabetes tritt bevorzugt im Kindes- und Jugendalter auf, kann sich jedoch auch im Erwachsenenalter als *latent autoimmune diabetes in adults* (LADA) manifestieren. Es lassen sich zwei Subtypen unterscheiden. Beim Typ-1a-Diabetes handelt es sich um eine immunologisch vermittelte Erkrankung, wobei als serologischer Marker verschiedene Autoantikörper [Inselzellantikörper (ICA), Glutamatdecarboxylase-Autoantikörper (GAD65A), Autoantikörper gegen Tyrosin-Phosphatase (IA-2A), Insulinautoantikörper (IAA)] nachgewiesen werden können [15, 16]. Genetische Faktoren spielen eine prädisponierende Rolle, etwa 90 % weisen charakteristische HLA-Assoziationen (HLA DR3, DR4) auf und etwa 10 % haben eine positive Familienanamnese [17, 18]. Beim seltenen Typ-1b-Diabetes ist die Genese der β -Zellzerstörung idiopathisch. Es lassen sich keine Autoantikörper nachweisen und es besteht kein Zusammenhang mit den HLA-Risikomerkmalen [19].

2) Beim Typ-2-Diabetes, mit Manifestation im höheren Erwachsenenalter, kommt es aufgrund einer verzögerten Insulinsekretion und Insulinresistenz zu einem relativen aber auch absoluten Insulinmangel. Als ursächlich wird nach dem aktuellen Wissensstand eine genetisch bedingte, multifaktorielle Krankheitsbereitschaft beschrieben. Zur Entwicklung des klinischen Krankheitsbildes kommt es unter dem Einfluss sogenannter Manifestations- oder Risikofaktoren, die eine Kombination aus ungesunder Ernährung, Bewegungsmangel und daraus resultierendem Übergewicht darstellen. Von den Typ-2-Diabetikern sind 80 % übergewichtig. Nach dem aktuellen Kenntnisstand sind ca. 90-95 % aller Diabeteserkrankungen dem Typ-2-Diabetes zuzuordnen [20].

- 3) Der Typ 3-Diabetes. Er lässt sich auf andere, recht unterschiedliche Ursachen wie z.B. genetische Defekte der β -Zellen (MODY), genetisch veränderte Insulinwirkung, Endokrinopathien, entzündliche, toxische oder neoplastische Pankreaserkrankungen zurückführen.
- 4) Bei der letzten Gruppe, dem Typ 4-Diabetes, handelt es sich um den Gestationsdiabetes, der eine Schwangerschaftskomplikation darstellt [14].

1.1.3 Epidemiologie

Der Diabetes mellitus gehört zu den großen weltweiten Volkskrankheiten mit steigender Prävalenz. Nach Angaben der International Diabetes Federation (IDF) 2015 sind aktuell weltweit 415 Millionen Menschen (8,8 %) der Weltbevölkerung an Diabetes erkrankt und 318 Millionen Menschen (6,5 %) in der Welt leiden an einer gestörten Glukosetoleranz [21]. In Deutschland liegt die Diabetesprävalenz laut bundesweiten Schätzungen des Robert-Koch-Instituts bei 7,2 % der 18- bis 79-Jährigen und auf der Basis von Daten gesetzlich Krankenversicherter aller Altersgruppen bei 9,9 %. Neben dem diagnostizierten Diabetes gibt es eine hohe Dunkelziffer an Patienten mit nicht erkannter diabetischer Stoffwechsellage. In der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) von 2008 bis 2011 wurde für die 18- bis 79-jährige Bevölkerung eine Prävalenz von etwa 2 % für den unerkannten Diabetes mellitus geschätzt [22]. Die Inzidenz von bekanntem und nicht bekanntem Diabetes beträgt für 18- bis 79-jährige nach Aussage des Bundes-Gesundheitssurvey 1998 (BGS98) etwa 507.000 neuer Erkrankungsfälle pro Jahr [23]. Im Jahr 2015 schätzt die IDF die weltweite Zahl an Todesfällen aufgrund von Diabetes auf rund 4,96 Millionen. Nach Angaben der *Global Burden of Disease*-Studie von 2010 hat sich die Mortalität zwischen 1990 und 2010 verdoppelt und steht damit weltweit an 9. Stelle der Todesursachenstatistik [24]. Daten des bundesweiten BGS98-Mortalitäts-*Follow-up* zeigen bei Vorliegen eines bekannten Diabetes ein 1,7-fach höheres Sterberisiko von 18- bis 79-Jährigen. Sollten die Diabeteszahlen - wie von der IDF befürchtet - steigen, würde es im Jahr 2040 weltweit rund 642 Millionen Diabetiker geben und die Prävalenz damit auf durchschnittlich 10,4 Prozent ansteigen. Die Anzahl der Menschen, die von einer Glukosetoleranzstörung betroffen sind, würde sich demnach weltweit auf 481 Millionen (7,8 %) erhöhen [21].

1.1.4 Komplikationen

Chronisch erhöhte Blutzuckerkonzentrationen bei unzureichend kontrolliertem bzw. nur suboptimal eingestelltem oder aber längerfristig unentdeckt gebliebenem Diabetes können zu Langzeitschäden, Funktionsstörungen und Funktionseinschränkungen unterschiedlicher Organe führen [21]. Entscheidend für die Lebenserwartung, die Lebensqualität sowie die Prognose des Diabetikers ist das Ausmaß der diabetischen Gefäßschädigung. Hierbei unterscheidet man eine diabetesspezifische Mikroangiopathie, welche auf morphologische Veränderungen der Kapillaren zurückzuführen ist, und eine diabetesassoziierte Makroangiopathie im Sinne einer Früharteriosklerose der mittleren und großen Arterien. Klinisch manifestiert sich die Makroangiopathie in Form einer koronaren Herzkrankheit, einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) und intrazerebraler arterieller Durchblutungsstörungen. Die Mikroangiopathie umfasst die diabetische Nephropathie, die diabetische Retinopathie und Neuropathien, wie die periphere sensomotorische Polyneuropathie und die autonome Neuropathie. Der „diabetische Fuß“ kann sowohl eine neuropathische als auch eine ischämische (PAVK) Ätiologie haben oder eine Kombination beider darstellen [25]. Die mikro- und makrovaskulären Spätkomplikationen führen zu einer durchschnittlichen Verringerung der Lebenszeit von 7 bis 8 Jahren [26]. Etwa 75 % der Diabetiker versterben verfrüht an kardiovaskulären Komplikationen [27]. Etwa 20-30 % der Diabetiker entwickeln eine diabetische Nephropathie, welche mit 19 % die häufigste Ursache des terminalen Nierenversages ist [25, 28].

1.1.5 Diagnosekriterien

Neben Anamnese und klinischer Untersuchung spielt die laboratoriumsmedizinische Diabetesdiagnostik eine zentrale Rolle. Nach Angabe der WHO und vieler Diabetes-Fachgesellschaften [104, 149, 150] zählen zu den Diagnosekriterien eines Diabetes mellitus:

- eine erhöhte Plasmaglukose zu einer beliebigen Tageszeit - unabhängig von der Nahrungsaufnahme - der sogenannten Gelegenheitsplasmaglukose $\geq 11,1$ mmol/l (≥ 200 mg/dl) zusammen mit dem Auftreten von klassischen Symptomen der Hyperglykämie (Gewichtsverlust, Polyurie, Polydipsie)
- eine Nüchtern-Plasmaglukose - nach 8 - 12 Stunden Nahrungskarenz - von $\geq 7,0$ mmol/l (≥ 126 mg/dl)
- eine Zwei-Stunden-Plasmaglukosekonzentration nach Aufnahme von 75g Glukose im oralen Glukosetoleranztest (oGTT) von $\geq 11,1$ mmol/l (≥ 200 mg/dl)
- eine HbA1c-Konzentration von $\geq 6,5$ % (≥ 48 mmol/mol Hb).

Wenn einer der oben genannten Kriterien erfüllt ist, dann ist eine Einzelbestimmung für die Diagnosestellung ausreichend, wenn der Messwert größer als die *Minimal Difference* ist, das heißt, er muss so weit von der diagnostischen Entscheidungsgrenze abweichen, dass der Laborwert mit Sicherheit erhöht ist. Andererseits muss ein Bestätigungstest mit demselben oder einem anderen von den vier oben genannten Labortests zur Sicherung der Diagnose innerhalb von ca. 14 Tagen durchgeführt werden [29]. Ausgenommen ist ein Bestätigungstest durch eine erneute HbA1c-Messung, wenn die Diabetesdiagnose bereits durch das HbA1c erfolgt ist. In diesem Fall ist die Bestätigung durch den oralen Glukosetoleranztest oder die Nüchternglukose durchzuführen. Der oGTT hat die höchste Sensitivität von den genannten vier diagnostischen Alternativen, so dass zum Ausschluss eines Diabetes bei klinischem Verdacht und ggf. HbA1c-Werten sowie Nüchtern-Glukose unterhalb der diagnostischen Kriterien die Durchführung eines oGTT empfohlen wird. Bei grenzwertigen Testergebnissen muss der Test nach 3-6 Monaten wiederholt werden. Liegen die Ergebnisse zweier unterschiedlicher diagnostischer Verfahren ober- und unterhalb des Grenzwertes, sollte das Testverfahren mit dem Wert oberhalb des Grenzwertes kontrolliert werden [30]. Pathologisch erhöhte Nüchternplasmaglukosewerte (sog. *impaired fasting glucose*, IFG) werden für einen Nüchternglukose-Bereich von 5,6 – 6,9 mmol/l (100 – 125 mg/dl) im venösen Plasma definiert. Bei einem Glukosewert von 7,8 – 11,0 mmol/l (140 - 199 mg/dl) nach oraler Aufnahme von 75g Glukose im oralen Glukosetoleranztest (75g-oGTT) handelt es sich um eine gestörte Glukosetoleranz (sog. *impaired glucose tolerance*, IGT) [13]. Bei Vorliegen einer IFG, IGT oder einem HbA1c-Wert von 5,7 - 6,4 % (39- 47 mmol/mol Hb) spricht man von einem Prädiabetes, einem Vorstadium des manifesten Diabetes mellitus, bei dem das Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse statistisch bereits signifikant erhöht ist. Das Risiko, dass ein Prädiabetes in einen manifesten Diabetes übergeht, liegt bei 5% [31].

1.2 Klinisch- chemische Untersuchungen der Blutglukose

Mit einem Anteil von 30 - 40 % zählt die Blutglukose zu einem der am häufigsten in einem klinisch chemischen Labor bestimmten Analyten [32]. Da nur durch regelmäßige Glukosemessungen im Patientenblut eine zuverlässige Verlaufskontrolle der diabetischen Stoffwechsellage und der Diabetestherapie erfolgen kann, wird die zentrale Rolle des Labors in der Diabetesdiagnostik verdeutlicht. Eine optimale Stoffwechseleinstellung ist insbesondere im Hinblick auf die steigenden Prävalenzzahlen und zur Verringerung der Morbidität und Mortalität durch makro- und mikroangiopathische Komplikationen, auch schon im Stadium eines prädiabetischen Stoffwechsels, unverzichtbar [33].

1.2.1 Chemische Bestimmungsmethoden

Um 1780 entwickelte Francis Home die Gärungsprobe, als erste, wenn auch sehr fehlerhafte, Labormethode zum Nachweis einer Glucosurie bei Diabetikern. Dabei konnte durch Zusatz von Hefe der im Urin befindliche Zucker zur Gärung gebracht werden [34, 35]. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts entwickelte Jean-Baptiste Biott ein Polarimeter zur Bestimmung der Glukose aus dem Urin durch die Messung des Ausmaßes der Ablenkung polarisierten Lichts [36]. Die quantitative Bestimmung von Glukose im Urin ist erstmals im Jahre 1841 durch die Einführung der Reduktionsmethode von Karl August Trommer möglich. Später gelang mit dieser Methode auch der Glukosenachweis im Blut [37]. Die oben genannten und weitere Methoden, die bis in die 60er Jahre zur Verfügung standen (u.a. die kolorimetrische Methode oder die o-Toluidin Methode), sind nicht spezifisch, denn sie erfassen auch andere Kohlenhydrate des Urins und Blutes (Galaktose, Mannose) [38–40]. Erst die Möglichkeit, Glukose enzymatisch zu bestimmen, führt zu einer spezifischen Erfassung der Glukose. In klinischen Labors werden heute die Glukoseoxidase/Peroxidase-Methode, die Hexokinase-Methode und die Glukose-Dehydrogenase-Methode durchgeführt. Die Hexokinase-Methode wird heute - wegen ihrer guten Reproduzierbarkeit und ihrer hohen Spezifität bei geringer Störanfälligkeit - international als Referenzmethode angesehen [41–43]. Zur Messung der Plasmaglukose im Zentrallabor oder auch im Rahmen der patientennahen Sofortdiagnostik (POCT) dürfen nur Labormethoden angewandt werden, die standardisiert und qualitätsgesichert sind und einen niedrigen Variationskoeffizienten (VK) der Messung von 1 – 3 % haben [29].

1.2.2 Probenmaterialien für die Blutglukosebestimmung

Bestimmt werden kann der Blutzucker aus Kapillarblut, Serum, Vollblut und Plasma. Dabei sind die Blutglukosewerte abhängig von der Art des Untersuchungsmaterials.

Kapillarblut: In der Blutbahn besteht für die Glukose ein Konzentrationsgefälle von der Arteriole über das Kapillarnetz bis hin zur Vene. Kapilläres Blut hat beim nüchternen Patienten eine 5 % höhere Glukosekonzentration als venöses Vollblut. Diese Differenz kann postprandial sogar 10 – 15 % betragen [44]. Die Verwendung von kapillären Blutproben zur Diabetesdiagnostik, sowie die Umrechnung von Glukosewerten aus kapillärem Vollblut oder kapillärem Plasma in venöse Plasmawerte, ist nicht zulässig.

Serum: Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich die Blutzuckerkonzentrationen in Serum und Plasma nur gering voneinander unterscheiden [45–48]. Dennoch wird die Bestimmung von Glukose aus dem Serum zur Diabetesdiagnostik nicht empfohlen, da zunächst die vollständig abgelaufene Blutgerinnung für 30-60 Minuten abgewartet werden muss, bevor die Zentrifugation der Serumprobe zwecks Glykolysehemmung erfolgen kann [49, 50].

Vollblut: Wegen des unterschiedlichen Wassergehaltes von Vollblut und Plasma misst man bei einem Hämatokrit von 43 % eine um ca. 11 % höhere Glukosekonzentration im Plasma [51]. Um im klinischen Alltag Verwechslungen zwischen Vollblut- und Plasmaglukosewerten zu vermeiden und einheitliche und vergleichbare Grenzwerte für die Diabetesdiagnostik zu definieren, gilt als internationaler Goldstandard die Bestimmung von Glukose aus dem venösem Plasma [30, 52]. Die Blutzuckerbestimmung aus venösem Vollblut (kein Kapillarblut) kann auch im Rahmen der sofortigen, patientennahen Messung der Blutglukose vor Ort direkt nach der Blutentnahme mit einem nach Herstellerempfehlungen zur Diagnostik zugelassenen Point-of-care-Messsystem (POCT) durchgeführt werden. Eine erfolgreiche Teilnahme an externen Ringversuchen ist hierfür empfohlen [30, 53, 54]. Da die diagnostischen Grenzbereiche ausschließlich für venöses Plasma bzw. Plasmaäquivalente (Umrechnung aus venösem Vollblut) gelten, müssen bei Messung aus venösem Vollblut die Glukosewerte anschließend mit einem Faktor von 1,11 (+ 11 %) in venöse Plasmawerte umgerechnet werden [51, 52, 54].

1.3 Präanalytik, Analytik und Postanalytik

Um eine hohe diagnostische Qualität der Blutglukosebestimmung zu gewährleisten, ist das Vermeiden von Fehlern in der präanalytischen, der analytischen und der postanalytischen Phase des Untersuchungsprozesses besonders wichtig [55]. Der Begriff Präanalytik beschreibt die Gesamtheit der Arbeitsschritte vor der eigentlichen Laboranalyse. Diese umfasst die Laboranforderung durch den Arzt, die Vorbereitung des Patienten (z.B., dass er nüchtern zur Blutentnahme kommt), sowie die Gewinnung, Aufarbeitung, Lagerung und den Transport des Untersuchungsmaterials. Die Analytik beschreibt die Durchführung der Bestimmung des Analyten mit der geeigneten Methode. Die Postanalytik beinhaltet die technische und medizinische Bewertung des Analyseergebnisses sowie die Erstellung eines definitiven Laborberichtes [56]. Die das Untersuchungsergebnis verfälschenden Fehler entstehen zu rund der Hälfte bis zu zwei Dritteln in der präanalytischen Phase, wie 2002 Bonini et al. in einer Metaanalyse zeigte: Bezogen auf alle Laboranalysen lassen sich die meisten Fehler mit 31-75 % dem Zeitraum vor der

eigentlichen Blutzuckermessung, also der präanalytischen Phase, zuordnen. Analytische Fehler liegen mit 13-31 % und postanalytische Fehler mit 9-31 % deutlich darunter. Die häufigsten Fehlerursachen sind hämolytische Proben (55%), ungenügende Probenmengen (21%) sowie falsche Probenmaterialien (12%) [57, 58]. Die Minimierung der präanalytischen Effekte ist für eine richtige Blutzuckerbestimmung von entscheidender Bedeutung.

1.3.1 Glykolyse

Eine wichtige präanalytische Einflussgröße vor Bestimmung der Blutglukose im Labor ist die ex vivo / in vitro Glykolyse. Nach der Blutentnahme findet in den korpuskulären Elementen des Blutes, vor allem in den Erythrozyten, aber auch in den Leukozyten und Thrombozyten, ein in vitro Glukoseverlust durch die fortgesetzte Glykolyse statt [59]. Die Glykolyse ist ein essentieller Stoffwechselweg (Embden-Meyerhof Weg) für den biochemischen Katabolismus von Kohlenhydraten. Sie findet, nach Aufnahme von Glukose in die Körperzellen, im Zytoplasma statt [60].

In den 1940er Jahren ist die Glykolyse erstmals zu einem großen Teil durch Otto Fritz Meyerhof und Gustav Embden in ihren einzelnen Reaktionsschritten aufgeklärt worden [61, 62]. Die Glykolyse dient durch den Abbau von Glukose zum Pyruvat der Energiegewinnung in Form von Adenosintriphosphat (ATP). In 10 Reaktionsschritten entstehen dabei aus einem Molekül Glukose netto 2 Moleküle NADH/H^+ , 2 Moleküle ATP und 2 Moleküle Pyruvat [63, 64].

Das Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse kann anschließend im Rahmen der aeroben Glykolyse in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA und weiter über den Citratzyklus zu CO_2 und H_2O oxidiert oder bei Sauerstoffmangel über die anaerobe Glykolyse im Zytosol durch die Laktat-Dehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert werden [65]. Gleichzeitig wird bei dieser Reaktion NADH/H^+ zu NAD^+ reoxidiert, welches für den sechsten Schritt der Glykolyse essentiell ist, damit diese auch unter vollständigem Sauerstoffmangel ablaufen kann [66]. Die Erythrozyten, welche circa 90 % der zellulären Bestandteile des Blutes ausmachen, sind für ihren Stoffwechsel obligat auf die Zufuhr von Glukose als Energiequelle angewiesen. Sie sind hochdifferenzierte kern- und organellenfreie Zellen. Da sie keine Mitochondrien besitzen und daher die mitochondrialen Stoffwechselleistungen fehlen, erfolgt die Energiegewinnung zu 90 % durch anaerobe Glykolyse und zu 10 % durch Glukoseverwertung über den Pentosephosphatweg [67, 68]. Die tägliche Glukoseutilisation des gesamten Körpers beträgt unter Ruhebedingungen beim Erwachsenen etwa 240 g, bzw. 3 g/kg Körpergewicht. Die Erythrozyten verwerten täglich etwa 20-30 g Glukose, bzw. 10 g/kg Blut, was 10 % des gesamten Glukoseumsatzes des Körpers entspricht [69, 70].

Mit Hilfe der Abbildung 1 lassen sich die zehn Reaktionsschritte der Glykolyse nachvollziehen. Bei der Hexokinase- und Phosphofruktokinase-Reaktion handelt es sich um Phosphorylierungen, bei denen zur Lieferung des Phosphats ATP gespalten wird. Diese Reaktionen sind stark exergon und damit irreversibel. Bei der Spaltung von Fruktose-1,6-Bisphosphat durch die Aldolase entstehen zunächst die zwei Isomere Glyceral-3-Phosphat und Glyceron-3-Phosphat. Um weiter reagieren zu können, wird Glyceron-3-Phosphat durch die Triosephosphat-Isomerase in Glyceral-3-Phosphat umgewandelt. Somit stehen ab dem sechsten Schritt der Glykolyse als Ausgangsprodukt 2 Moleküle Glyceral-3-Phosphat zur Verfügung, sodass die Reaktionen jeweils zweimal pro Glukosemolekül ablaufen kann [60]. Im siebten und zehnten Schritt, der 3-Phosphoglyceratkinase- und Pyruvatkinase-Reaktion, handelt es sich um eine Substratketten-Phosphorylierung, bei der außerhalb der Atmungskette ohne Beteiligung von Sauerstoff ATP synthetisiert wird. Die Pyruvatkinase-Reaktion ist exergon und irreversibel [64]. Die Regulation der Glykolyse erfolgt über ihre drei Schlüsselenzyme, die Hexokinase, die Phosphofruktokinase und die Pyruvatkinase. Die Geschwindigkeit dieser Reaktionen ist abhängig von der Enzymaktivität und nicht vom Substratangebot. Die Phosphofruktokinase-Reaktion ist der langsamste Schritt der Glykolyse und daher geschwindigkeitsbestimmend und wird deshalb als Schrittmacherreaktion bezeichnet. Die Schrittmacherenzyme werden allosterisch reguliert [61]. Die Hexokinase wird durch ihr Produkt, das Glukose-6-Phosphat, über die allosterische Rückkoppelung gehemmt. Hohe Spiegel von ATP und Citrat regulieren die Phosphofruktokinase allosterisch, indem sie die Affinität des Enzyms für das Substrat Fruktose-6-Phosphat hemmen. AMP aktiviert das Enzym allosterisch. Das dritte Schrittmacherenzym, die Pyruvatkinase, wird ebenfalls durch ATP und Alanin allosterisch gehemmt und durch Fruktose-1,6-Bisphosphat im Sinne einer positiven Verstärkung aktiviert. Ein sinkender pH-Wert hemmt ebenfalls die Aktivität der Hexokinase und Phosphofruktokinase [60, 70].

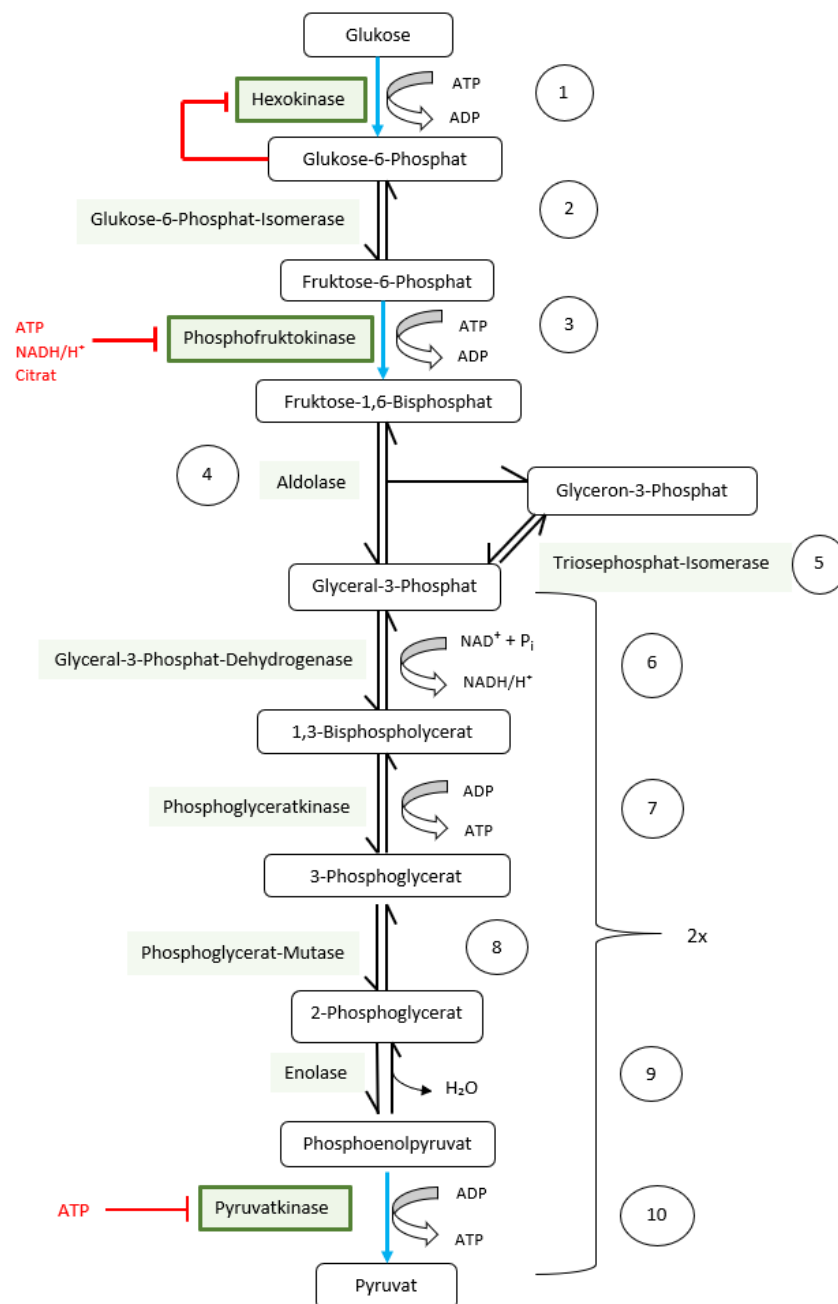


Abb. 1: Reaktionsschritte der Glykolyse (in Anlehnung an: Sokolov et al. 2015 [63])
 [Die blauen Pfeile kennzeichnen die irreversiblen Reaktionen. Die rot hervorgehobenen Striche stellen die Hemmung der Schlüsselenzyme dar.]

1.3.2 Stabilisierung der Glukose in vitro

Um den Verlust an Glukose durch die Glykolyse während des Transports zum Labor möglichst gering zu halten und um folglich falsch niedrige Messwerte durch einen Glukosekonzentrationsabfall zu vermeiden, sind Maßnahmen zur Glykolyseinhibition zwingend erforderlich. Für die Glykolyseinhibition ist neben der sofort einsetzenden Wirkung der Stoffwechselhemmung auch die zeitliche und temperaturabhängige Stabilität wichtig. Außerdem sollte der zugesetzte Glykolyseinhibitor nicht mit den Methoden zur Bestimmung der Blutglukose oder mit anderen Analyten interferieren, keine Hämolyse verursachen und eine gute Zellmembranpermeabilität besitzen. Eine Stabilisierung der Glukose in Blutproben kann durch chemische und physikalische Maßnahmen erfolgen.

1.3.2.1 Chemische Glykolyseinhibitoren

Natriumfluorid: Natriumfluorid (NaF) kann allein in einer Konzentration von 4,3 mg/ml Blut oder in Kombination mit Na₂-EDTA oder K₂-EDTA (1mg/ml Blut) oder Kaliumoxalat (2mg/ml Blut) in einer Konzentration von 2,5 mg/ml als Glykolyseinhibitor verwendet werden [71]. Es hemmt die Enolase, den neunten, relativ späten Schritt der Glykolyse. Weiter proximal vorgeschaltete Enzyme bleiben aktiv und die Glukosemetabolisierung wird bis zur Enolasereaktion fortgesetzt. Der Glukoseabbau in vitro setzt sich daher fort und die Nüchternplasmaglukose nimmt um 3- 6 % innerhalb der ersten 1 - 2 Stunden von der Blutentnahme bis zur Messung im Labor ab [72]. Erst nach etwa vier Stunden kommt es zu einer wirksamen Hemmung der Glykolyse, erst danach bleibt die Glukosekonzentration im Probegefäß für bis zu 3 Tagen stabil. [73–75].

Iodacetat: Iodacetat eignet sich allein oder in Kombination mit Lithiumheparin (14,3 U/ml) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml Blut ebenfalls zur Glykolysehemmung [71]. Iodacetat ist ein alkylierendes Agens und hemmt das Enzym Glyceral-3-Phosphat-Dehydrogenase, und damit den sechsten Reaktionsschritt der Glykolyse, irreversibel [76]. Iodacetat bildet mit essentiellen Cysteinresten im aktiven Zentrum der Glyceral-3-Phosphat-Dehydrogenase Thioetherbindungen, so dass eine Reaktion mit dem physiologischen Substrat Glyceral-3-Phosphat nicht mehr möglich ist [77]. Ähnlich wie beim Natriumfluorid setzt die vollständige Glykolysehemmung erst nach etwa 3 Stunden ein und stabilisiert die verbleibende Glukosekonzentration dann aber bis zu 3 Tagen [75]. Foucher et al. haben in den ersten 2 Stunden trotz Zugabe von Iodacetat einen Abfall

der Glukosewerte von 9 % beobachtet [78], was dadurch zu erklären ist, dass die hemmende Wirkung erst nach etwa 2 Stunden eintritt.

Mannose: Mannose ist ein Epimer der Glukose und wirkt als kompetitiver Inhibitor der Hexokinase, der ersten enzymatischen Reaktion der Glykolyse. Die hemmende Wirkung setzt sofort ein, hält aber nur 4 Stunden bei Raumtemperatur an [71]. Aus diesem Grund wird ausschließlich eine Kombination von Mannose (3mg/ml) mit Natriumfluorid empfohlen, da die antiglykolytische Wirkung von Natriumfluorid nach etwa 4 Stunden eintritt und somit die Glukose *in vitro* kontinuierlich stabil bleibt [75, 79]. Nachteilig ist, dass bei Übersteigen des Konzentrations-Sollwertes von 3 mg/ml Blut Mannose im Entnahmeröhrchen, z.B. durch Unterfüllung, im Labor bis zu 1,0 mmol/l höhere Glukosewerte gemessen werden [80]. Außerdem kann Mannose mit den Blutzuckermessmethoden interferieren, wenn diese auf der Glukoseoxidase- oder Hexokinase-Methode beruhen [32].

Enteiweißung: Ergänzend sollte auch die Enteiweißung des Bluts als Methode zur Hemmung des Glukoseabbaus erwähnt werden. Traditionell wurde dazu Trichloressigsäure oder Perchlorsäure verwendet. Aufgrund des Volumenverdrängungseffektes durch die Enteiweißung der Probe, kommt es jedoch zu einer Erhöhung der Glukosewerte im Vergleich zum Ausgangsmaterial und zwar um 5%, wenn Plasma, um 10%, wenn Vollblut, und um 15%, wenn hämolysiertes Vollblut enteiweißt wird [44, 75].

1.3.2.2 Physikalische Methoden der Glykolyseinhibition

Sofortige Zentrifugation: Durch die Trennung der zellulären Bestandteile des Blutes vom Plasma bleibt die Glukose im venösen Plasma stabil. Hierbei wird die Vollblutprobe innerhalb von 15 Minuten nach der Blutentnahme in einer Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert und der Plasmaüberstand in ein Sekundärprobengefäß abpipettiert. Das Plasma kann nach der Zentrifugation auch im Originalröhrchen verbleiben, wenn das Primärprobengefäß ein Trenngel oder einen eingesetzten Filter enthält [81]. Die Probe kann dann gekühlt versandt und innerhalb von 24 Stunden in einem medizinischen Labor und gemessen oder alternativ sofort bei -20°C eingefroren und dann zu einem späteren Zeitpunkt gemessen werden. Im Praxisalltag erweist sich dieses Verfahren jedoch als wenig praktikabel, da häufig die geeignete Zentrifuge oder der für Blutproben zugelassene Gefrierschank fehlt [82, 83].

Kühlung: Bei der sofortigen Kühlung des Vollblutes auf 4°C auf schmelzendem Eis (Eiswasser) mit Messung der Blutglukose innerhalb von 4 Stunden, haben Lin et. al lediglich eine Abnahme der Glukosekonzentration von 0,02 mmol/l pro Stunde bei Erwachsenen beobachtet. Eine längerfristige Kühlung in Eiswasser bis zur Zentrifugation und Plasmazellseparation hat sich im Praxisalltag nicht bewährt und wird nicht empfohlen [82, 84].

Absenkung des pH-Wertes: Die effektivste Methode zur sofortigen und kompletten Glykolysehemmung im Vollblut ist die Enolaseinhibition mit Natriumfluorid und Ansäuerung des Blutes mit Citratpuffer. Bei einem pH-Wert von 5.3 - 5.9 werden die pH-abhängigen Enzyme Hexokinase und Phosphofructokinase schon in dem ersten und dritten Schritt des Glykolyseweges in den Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten inaktiviert [32]. Durch die Absenkung des pH-Wertes bleibt die Blutglukose über 8 Stunden konstant und zeigt erst nach 24 Stunden eine geringe Abnahme von $0,07 \pm 0,06$ mmol/l (1,1 -1,3 mg/dl) [85].

Es sind derzeit auf dem Markt verschiedene citrathaltige Blutentnahmesysteme verfügbar, welche je nach Hersteller Citrat als Granulat oder flüssigen Citratzusatz enthalten (Tabelle 1) [30]. In Abhängigkeit von dem jeweiligen Additiv müssen die Vorgaben der Hersteller befolgt und auf eine korrekte Handhabung geachtet werden. Enthalten Blutentnahmeröhrchen Citrat in flüssiger Form, so ist die korrekte Füllung bis zur Markierung am Entnahmeröhrchen unbedingt erforderlich. Eine Über- oder Unterfüllung muss vermieden werden, um Verdünnungsfehler zu vermeiden. Anschließend muss man das Blut mit dem Puffer durch vorsichtiges Schwenken ausreichend vermischen. Bei Unterfüllung der Entnahmeröhrchen kann es zu Abweichungen im Ergebnis von ca. -4 % bis ca. +3 % kommen [86]. Zudem führt der flüssige Zusatzstoff zu einer Plasmaverdünnung, weshalb die Multiplikation des Messergebnisses mit einem vom Hersteller angegebenen Verdünnungsfaktor notwendig ist. Bei Entnahmesystemen mit dem Citratpuffer als Granulat ist eine korrekte Lösung durch sofortiges mehrmaliges vorsichtiges Schwenken (je nach Herstellervorschrift 5- bis 10-mal) zu beachten [30, 83].

Hersteller	Bezeichnung	Volumen	Zusätze	Bemerkungen
Sarstedt	S-Monovette® GlucoEXACT	3,1 ml	NaF/Citrat/EDTA	flüssige Additive, Verdünnungsfaktor 1,16
Greiner bio-one	Vacurette® FC-Mix	2 ml/3ml	EDTA/NaF/Citrat/ Natriumazid	Granulat, kein Korrekturfaktor
Kabe Labortechnik	Primavette® S	2,6 ml	NaF/Citrat	flüssige Additive, Verdünnungsfaktor 1,16
Kabe Labortechnik	Kabevette® G	3,5 ml	NaF/Citrat	flüssige Additive, Verdünnungsfaktor 1,16

Tabelle I: Natriumfluorid/Citrat-haltige Blutentnahmeröhrchen verschiedener Hersteller [30]

1.4 Glykiertes Hämoglobin A1c

Die Erstbeschreibung des mit Glukose glykierten Hämoglobin A1 (HbA1c) erfolgt 1968 durch Samuel Rahbar aus Teheran. Eher zufällig im Zusammenhang mit seinen Untersuchungen zu neuen Hämoglobinvarianten findet er heraus, dass Diabetiker erhöhte HbA1c-Werte aufweisen [87, 88]. Der HbA1c-Wert beschreibt den Anteil des mit Glukose verbundenen Hämoglobins am Gesamthämoglobin und ist ein Indikator für die längerfristige Glukosekonzentration im Blut. Wegen der Erythrozytenüberlebenszeit von 100 bis 120 Tagen erhält man bei Messung des HbA1c-Anteils am Hb eine zuverlässige Aussage zur mittleren Plasmaglukosekonzentration der vorangegangenen 8 bis 12 Wochen [89]. Der HbA1c-Wert dient der Beurteilung der Güte der Langzeiteinstellung des Blutzuckers und ist mit der Entwicklung diabetischer Komplikationen korreliert [90].

Zur Bestimmung des HbA1c kann EDTA-Blut, Heparin-Blut oder Kapillarblut verwendet werden. Als Routineverfahren zur Analyse des HbA1c stehen die Kationenaustausch-Chromatographie, Kapillarelektrophorese, Affinitätschromatographie, Immunoassays und enzymatische Bestimmungen zur Verfügung [44]. Neben der HbA1c-Bestimmung im Zentrallabor kann die Messung auch vor Ort als patientennahe Sofortdiagnostik (POCT) mit *Unit-use*-Reagenzien erfolgen, wenn die POCT-Systeme vom Hersteller für die Analytik zugelassen sind [30].

Frühere Studien aus den 90er Jahren haben gezeigt, dass die verschiedenen Routinemethoden vor Einführung einer einheitlichen Referenzmethode unterschiedliche Ergebnisse liefern [91–94].

Ein Methoden- oder Laborwechsel kann Werteänderungen ergeben, die methodenbedingt sind und keine Aussage über eine veränderte Stoffwechseleinstellung erlauben.

Zur weltweiten Standardisierung des HbA1c unter dem Aspekt einer internationalen Vergleichbarkeit und Stabilität auf höchster Ebene der Richtigkeit veröffentlichte 2002 die *International Federation for Clinical Chemistry* (IFCC) eine neue Referenzmethode [148]. In Europa dürfen nur noch Produkte verkauft und Methoden angewandt werden, die auf die analytisch fundierte IFCC-Referenzmethode zurückführbar sind. Das HbA1c wird nach dem IFCC-System in mmol/mol Hb angegeben. Obwohl in Deutschland seit Januar 2009 diese internationale SI- Einheit empfohlen wird, hat sich die Anwendung in der täglichen Routine noch nicht einheitlich durchgesetzt. Die herkömmlichen Werte können in Prozenten umgerechnet werden, wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt ist [95, 96].

Die Zusammenhänge zwischen HbA1c-NGSP und HbA1c-IFCC sind wie folgt:

HbA1c (NGSP) [%]	= HbA1c (IFCC) [mmol/mol Hb] x 0,0915 + 2,15
------------------	--

HbA1c (IFCC) [mmol/mol Hb]	= (HbA1c (NGSP) [%] - 2,15) / 0,0915
----------------------------	--------------------------------------

Die Verwendung des HbA1c-Wertes im Vergleich zur Nüchtern-Glukosemessung zur Diabetesdiagnostik hat folgende Vorteile:

- der HbA1c-Wert kann unabhängig von der Tageszeit bestimmt werden
- der Patient muss nicht nüchtern sein
- die intraindividuelle biologische Variabilität ist geringer ($\pm 1,7\%$) als bei der Bestimmung der Plasmaglukose ($\pm 5 - 14\%$) [97, 98]
- akute Einflussfaktoren wie eine akute Infektion, Stress und Steroide wurden bisher nicht berichtet [29]
- das HbA1c hat eine höhere präanalytische Stabilität im Vergleich zu Glukose, da die Glykierung im Blut irreversibel ist [99]. Im Vollblut ist das HbA1c bei 4°C eine Woche stabil, bei -70°C circa ein Jahr [44].

2 FRAGESTELLUNG

Die hier vorgelegte retrospektive Untersuchung wurde am MVZ der Medizinisch-Diagnostischen Institute in Berlin durchgeführt. Entsprechend der Empfehlung der Deutschen Diabetes Gesellschaft und Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe im Jahr 2011 [82] wurde an diesem Einsendelabor für die Blutzuckeranalytik am 01.01.2015 ein neues Glukoseabnahmesystem eingeführt, welches als zusätzlichen Glykolysehemmer neben Natriumfluorid auch Citratpuffer als Granulat oder flüssigen Zusatz enthält.

In der Studie sollten die Nüchternplasmaglukosewerte, die in den Jahren 2014 und 2015 in den eingesandten Proben der Patienten gemessen wurden miteinander verglichen werden, um Unterschiede in der Wertelage vor und nach der Umstellung zu ermitteln.

Weiterhin sollte der Einfluss der nach der Umstellung gemessenen Werte auf die Einschätzung der diabetischen Stoffwechsellage, bezogen auf die glukosebasierten Diagnosekriterien der aktuellen Leitlinien, analysiert werden.

Die parallel über beide Jahre gemessenen HbA1c-Konzentrationen sollten dahingehend untersucht werden ob eine veränderte diabetische Stoffwechsellage der Patienten Ursache für die möglicherweise verändert gemessenen Glukosekonzentrationen ist und ob die verändert gemessenen Glukosewerte zu Maßnahmen des behandelnden Arztes, im Sinne einer verbesserten Einstellung des Blutzuckers geführt haben. Außerdem sollte untersucht werden inwieweit eine Neubewertung der Glukosewerte mit der HbA1c-Wertelage korreliert.

Schließlich sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob die bei dieser Untersuchung erhobenen Ergebnisse eine Überprüfung der geltenden Richtwerte und Interventionsgrenzen für die Einstufung der Stoffwechselsituation notwendig machen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine deskriptive retrospektive Studie, die den Zeitraum vom 01.01.2014 bis zum 31.12.2015 umfasst. Mit der Erfassung und Bewertung der in diesem Zeitraum erfassten Blutzuckerwerte, soll geprüft werden, ob die Einführung von mit Citrat und Natriumfluorid versetzten Blutentnahmeröhrchen für die Bestimmung der Nüchternplasmaglukose zu relevant veränderten Wertelagen führt. Aufgrund einer Entscheidung der Leitung des MVZ der Medizinisch-Diagnostischen Institute GmbH wurden die Entnahmegefäße am 01.01.2015 in den Einsendepraxen ausgetauscht. Für die Beantwortung der genannten Fragestellung mussten die Messwerte der Patienten aus dem Laborinformationssystem ausgelesen und statistisch bearbeitet werden.

3.2 Beschreibung der Patientenkollektive

3.2.1 Patientengesamtkollektiv

Insgesamt wurden 193.899 Nüchternglukosekonzentrationen von 53.046 Patienten ermittelt, welche aus insgesamt 600 verschiedenen Einsendepraxen stammten. Der weiteste Transportweg, der aus der Region Berlin, Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern stammenden Proben, betrug 156 Kilometer. Die Transportzeit muss aufgrund verschiedener Transportrouten mit 2,5 bis 4,5 Stunden kalkuliert werden; hinzu kommt die Zeit zwischen Blutentnahme und Abholungszeitpunkt. Die Verteilung der Blutzuckerwerte des gesamten Patientenkollektivs ($n=53.046$) und die jeweiligen Jahresdurchschnittswerte werden im Untersuchungszeitraum analysiert und für die Jahre 2014 und 2015 verglichen.

Alters- und Geschlechterverteilung: Wie in Abbildung 2 dargestellt, waren 53.033 Patienten zu Beginn der retrospektiven Untersuchung am 01.01.2014 zwischen einem und 104 Jahren alt. Von 13 Patienten lagen keine Geburtsdaten vor. Im Mittel betrug das Alter 64 ± 15 Jahre. Bei Beginn der Studie ergab sich folgende Verteilung: Die Anzahl der Patienten, welche zum Untersuchungsbeginn ≤ 60 Jahre alt waren, betrug 20.310 (38 %).

Mehr als die Hälfte der Patienten (52 %) war zwischen 60 und 80 Jahren alt ($n= 27.545$) und 5178 Patienten (10 %) waren älter als 80 Jahre.

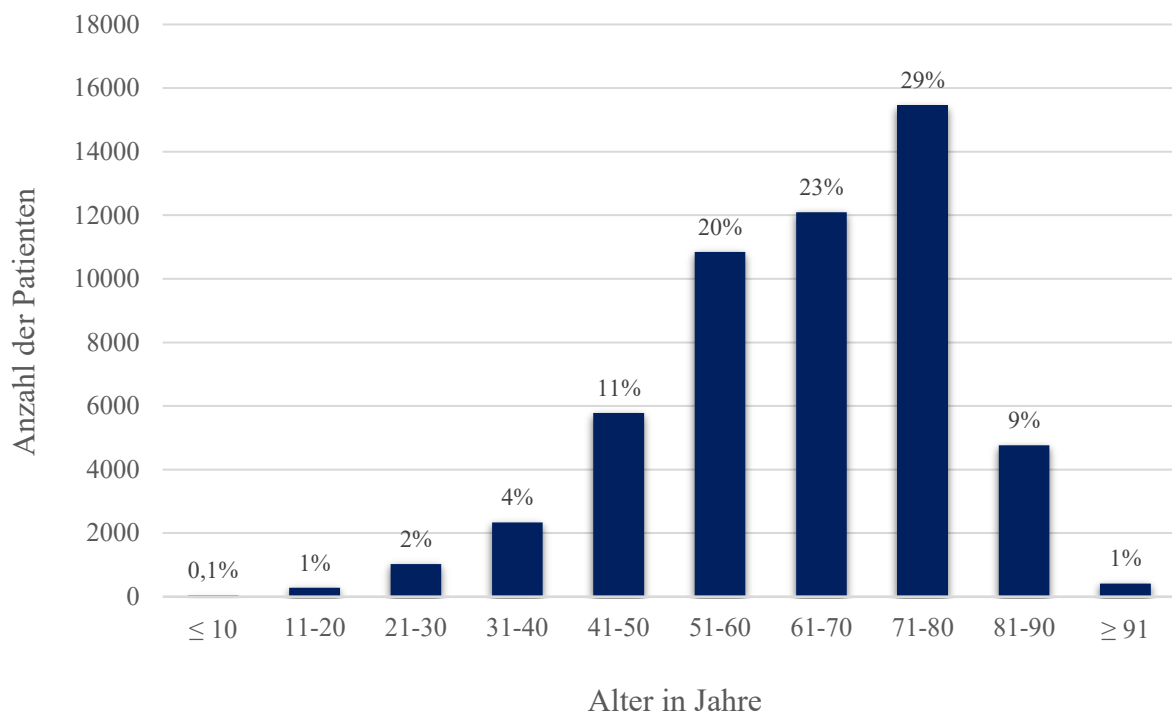


Abb. 2: Altersverteilung des Gesamtkollektivs in 10-Jahres-Intervallen

Die Geschlechterverteilung, welche Abbildung 3 entnommen werden kann, zeigt einen Anteil von 56% weiblicher und 44 % männlicher Patienten. Bei 14 Patienten lagen keine Informationen zum Geschlecht vor.

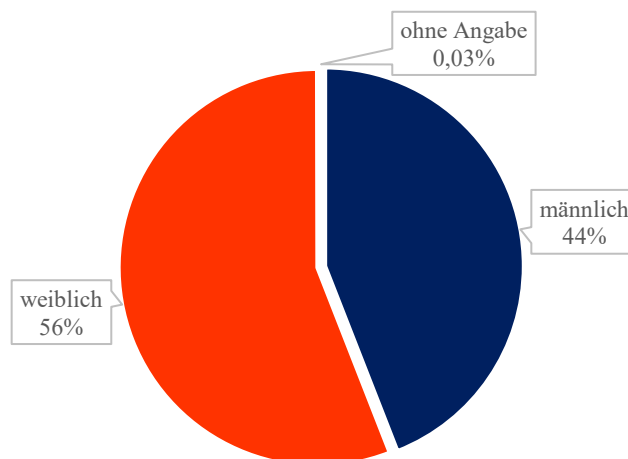


Abb. 3: Geschlechterverteilung des Gesamtkollektivs

3.2.2 Verlaufsstudienkollektiv

Anhand eines Teilkollektivs von 201 Patienten sollten die, nach Einführung der neuen Entnahmesysteme, gemessenen Glukoseveränderungen im Verlauf untersucht werden.

Das Verlaufsstudienkollektiv wurde nach definierten Einschluss- und Ausschlusskriterien selektiert. Es wurden Patienten mit Blutzuckerwerten eingeschlossen, die einen um 20 % höheren jahresdurchschnittlichen Blutzuckerwert im Jahr 2015 nicht überschritten haben und bei denen mindestens fünf Blutzuckermessungen im Jahr in unterschiedlichen Monaten erfolgt sind. Die Patienten, welche einen mehr als 20 % höheren gemittelten Blutzuckerwerte im Vergleich zum Vorjahr hatten, wurden ausgeschlossen, weil nach der derzeitigen publizierten Studienlage [130, 131] durch die citrathaltigen Entnahmeröhrchen ein gemessener Glukosekonzentrationsanstieg kleiner als 20 % zu erwarten war. Von der Auswertung wurden 26 Patienten ausgeschlossen, da bei Ihnen mindestens drei extreme Blutzuckerwerte im Jahr gemessen wurden, die den Verdacht auf fehlende Compliance nahelegten. Um zu vermeiden, dass es durch Ausreißerwerte zur Verfälschung der durchschnittlichen Glukosejahreswerte kommt, wurden die Median- und Mittelwerte miteinander verglichen. Kam es zu deutlichen Differenzen wurden die gemessenen Glukosewerte auf Ausreißer überprüft. Bei drei Patienten fiel auf, dass sich jeweils ein Messwert deutlich von den anderen, in dem jeweiligen Jahr ermittelten Messwerten abhebt. Ein Wert wurde dann als extremer Ausreißer definiert, wenn er sich 2,5 Standardabweichungen ober- oder unterhalb des Nüchternglukosejahresmittelwertes befand. Dieser extreme Ausreißerwert wurde ausgeklammert und in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

Die in diesem Kollektiv eingeschlossenen Patienten wurden auch unter dem Kriterium parallel in regelmäßigen Abständen gemessener HbA1c-Werte rekrutiert. Für die HbA1c-Bestimmung gilt, dass nur jene Patienten eingeschlossen wurden für welche mindestens zwei HbA1c-Messungen im Jahr vorlagen.

Alters- und Geschlechterverteilung: Zu Beginn der Studie am 01.01.2014 waren die Patienten des Verlaufsstudienkollektivs zwischen 23 und 91 Jahre alt. Im Mittel betrug das Alter 69 ± 12 Jahre. Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, dass 44 Patienten (21,5 %) zwischen 21 und 60 Jahre alt waren. Mit einer Anzahl von 134 (66 %) waren mehr als die Hälfte im Alter zwischen 61 bis 80 Jahre alt und nur 23 Patienten (11,5 %) waren älter als 81 Jahre. Wie die Abbildung 5 zeigt, bestand ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis zwischen den Geschlechtern. 49 % Patienten (n= 99) waren männlich und 51 % (n= 102) Patienten waren weiblich.

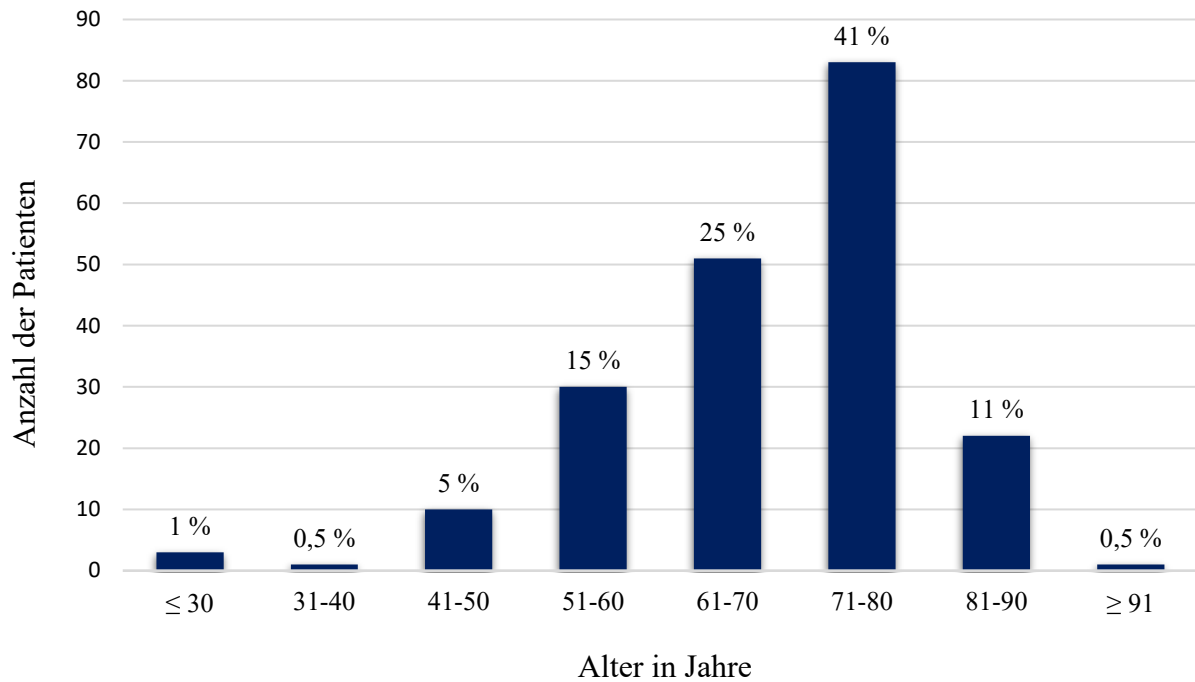


Abb. 4: Altersverteilung des Verlaufsstudienkollektivs in 10-Jahres-Intervallen

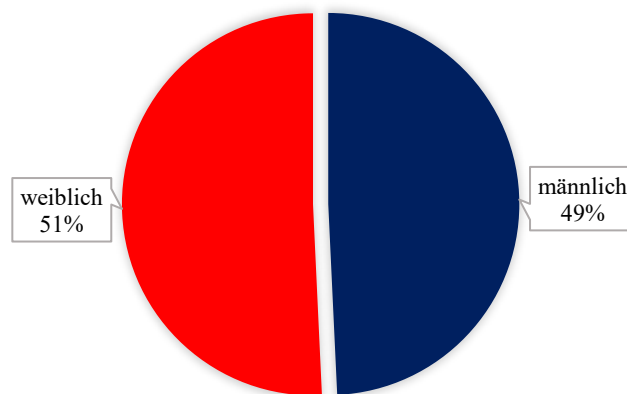


Abb. 5: Geschlechterverteilung des Verlaufsstudienkollektivs

3.3 Datenerfassung und Bearbeitung

Die Patientendaten wurden mit Hilfe des Laborinformationssystems MCS Promed der Firma MIPS aus Walluf erhoben. Die Datenerfassung für das Gesamtkollektiv beinhaltete das Geburtsdatum, das Geschlecht sowie die Ergebnisse ihrer Blutzuckerbestimmungen von Januar 2014 bis Dezember 2015.

Für das Verlaufskollektiv lagen zusätzlich die HbA1c-Werte von Januar 2014 bis Dezember 2015 vor. Alle erhobenen Daten wurden zur Auswertung anonymisiert nach Eingabe in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel 2016 abgespeichert.

Vor Beginn der Studie wurde die Studie der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock vorgelegt. Das positive Votum der Kommission wurde mit Bescheid vom 10.10.2016 (Registriernummer: A 2016-0179) mitgeteilt (siehe Anlage 1).

3.4 Methoden der statistischen Datenauswertung und grafischen Darstellung

Die Daten werden tabellarisch und grafisch unter Verwendung von Histogrammen, Liniendiagrammen, Kreisdiagrammen, Boxplots und Kerndichteschätzung nach der Parzen-Fenster-Methode dargestellt. Die statistische Auswertung der Messwerte, sowie die Erstellung der Grafiken, erfolgte mit Microsoft® Excel 2016, Sigma Plot 13.0 und dem Statistikprogramm R Version 3.3.1. Zur Überprüfung des statistisch signifikanten Unterschieds zwischen den Blutzucker- und HbA1c-Jahresmittelwerten von 2014 und 2015 erfolgte zunächst die Testung auf eine Normalverteilung durch den Kolmogorow-Smirnow Test. Da die Daten für die Blutglukose einer Normalverteilung unterliegen, wurde die statistische Auswertung anschließend mit dem paarigen t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Der Kolmogorow-Smirnow Test für die HbA1c Daten ergab, dass diese nicht normalverteilt sind, sodass der statistische Vergleich mit dem parameterfreien Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Wilcoxon signed rank test) für verbundene Stichproben durchgeführt wurde. Unterschiede werden bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant und bei einem p-Wert von $p < 0,001$ als hochsignifikant bewertet.

Kerndichteschätzung: Während das Histogramm einen ersten Überblick über die Datenverteilung gibt, lässt sich mit Hilfe des statistischen Verfahrens der Kerndichteschätzung nach der Parzen-Fenster-Methode [100, 101] eine Dichtefunktion bestimmen, welche die stetige Wahrscheinlichkeitsverteilung der Patientenwerte mithilfe mathematischer Berechnungen schätzt, um einen visuellen Eindruck der Verteilung zu vermitteln. Im Gegensatz zu einem Histogramm werden bei der nichtparametrischen Kern-Dichte-Schätzung keine festen Intervalle definiert, sondern gewissermaßen ein gleitender Durchschnitt gebildet. Die in dieser Arbeit erstellten Kerndichteschätzungen basieren auf dem in dem Statistikprogramm R 3.3.1 definierten Epanechnikov-Kern.

Boxplots: Boxdiagramme stellen Messergebnisse eines untersuchten Merkmals graphisch als Box dar, um die Lage und Verteilung der statistischen Kennzahlen zu visualisieren.

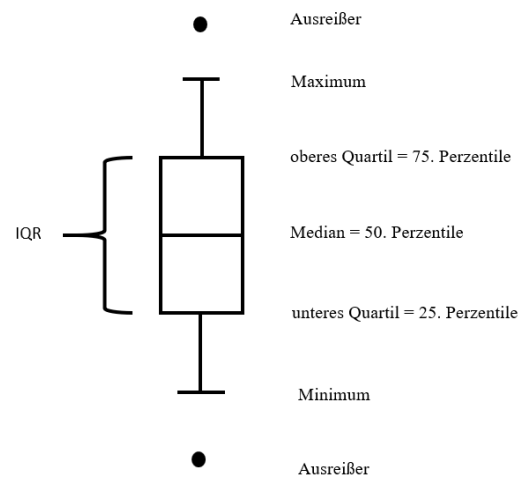


Abb. 6: Schematische Darstellung eines Boxplots in SPSS
[Unteres Quartil: 25% der Daten sind kleiner oder gleich diesem Kennwert; Oberes Quartil: 75% der Daten sind kleiner oder gleich diesem Kennwert; IQR = Interquartilsabstand: umfasst 50% der Daten]

Der Boxplot, in Abbildung 6 schematisch dargestellt, besteht aus einer zentralen Box. Die Ränder der Boxen entsprechen dem unteren und dem oberen Quartil (25. und 75. Perzentile). Der Bereich zwischen den Quartilen, in dem sich 50% der Messwerte befinden, nennt sich Interquartilsabstand (engl. *Interquartilerange* = IQR). Der Querbalken in der Mitte der Box kennzeichnet den Median, also die 50. Perzentile. Die von der Box ausgehenden Linien (sog. *Whiskers*) oberhalb und unterhalb der Box kennzeichnen den höchsten und niedrigsten Messwert und sind maximal 1,5-mal so lang wie der Interquartilsabstand. Werte, die zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen vom oberen Quartilswert nach oben bzw. vom unteren Quartilswert nach unten abweichen, werden als Ausreißer bezeichnet. Sie werden durch einen Punkt gekennzeichnet [102, 103].

3.5 Blutentnahme

Die Bestimmung der Nüchternplasmaglukose erfolgte aus venösem Plasma. Die zur venösen Blutentnahme verwendete Punktionsstelle sowie das Venenpunktionsbesteck variierten je nach Einsendepraxis.

Im Jahr 2014 wurden Blutentnahmegefäße verwendet, die nur Natriumfluorid zur Glykolysehemmung enthielten. Hierbei handelte es sich um die Entnahmegefäße Primavette® S Glucose von Kabe Labortechnik (2,6 ml, Natriumfluorid (2,5 mg/ml) und EDTA (1 mg/ml),

Referenznummer 09593011), sowie das Vacutainer® Röhrchen von Becton-Dickinson (2 ml, Natriumfluorid (2,5 mg/ml) und Kaliumoxalat (2 mg/ml), Referenznummer 368920). Welches Röhrchen von den jeweiligen Praxen eingesendet wurde, hing von dem jeweils in der Praxis verwendeten Entnahmesystem (Aspirationssystem oder Vakuumsystem) ab. Nach Modifizierung der Blutentnahmeröhrchen im Januar 2015 wurden Blutentnahmegefäße eingeführt, welche zusätzlich zu Natriumfluorid einen Citratpuffer enthalten. Verwendet wurden das Vacuette®GLUCOMEDICS Röhrchen von Greiner Bio-One (2 ml, Natrium-EDTA, Natriumfluorid, Citrat flüssig und Natriumcitrat, Referenznummer 454347), sowie das Primavette® S Citrat/NaF Röhrchen von Kabe Labortechnik (3,1 ml, Natriumfluorid und Citrat, Referenznummer: 09593545). Bei den Produkten dieser beiden Firmen liegen Natriumfluorid und Citratpuffer in flüssiger Form vor. Dies machte eine Befüllung der Röhrchen mit Blut exakt bis zur Markierung notwendig. Zudem musste das Blut mit der Flüssigkeit in den Röhrchen durch mehrmaliges Schwenken ausreichend vermischt werden. Diese Informationen zur Neuerung im Umgang mit den modifizierten Blutentnahmeröhrchen erhielt das Praxispersonal vor Ort im Januar 2015 durch laboreigenes Schulungspersonal.

Die Bestimmung des HbA1c erfolgte aus venösem Vollblut. In den Vergleichsjahren wurden die gleichen Entnahmegefäße verwendet (Primavette® S EDTA-Röhrchen von KABE Labortechnik (2,6 ml, EDTA-K3E, Referenznummer 09590510), sowie das VACUETTE® Röhrchen K3E K3EDTA von Greiner Bio-One (3ml, Referenznummer 454217)).

3.6 Messmethoden und Messgeräte

Glucose: Die Glukosebestimmungen aller Blutentnahmegefäße erfolgte enzymatisch mit der Hexokinase-Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode am Abbott ARCHITECT c16000 Clinical Chemistry Analyzer. Dabei wird Glukose in Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen durch die Hexokinase phosphoryliert, wobei Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und ADP entstehen.

Durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase erfolgt die spezifische Oxidation von G-6-P zu 6-Phosphoglukonat bei gleichzeitiger Reduktion von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) zu reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH). Pro Mikromol verbrauchter Glukose wird ein Mikromol NADH produziert. Das erzeugte NADH absorbiert Licht bei 340 nm und wird spektrophotometrisch als erhöhte Extinktion gemessen. Die Unpräzision des Glukose Assay liegt bei ≤ 5 % Gesamt-VK.

HbA1c: Als Verfahren zur Analyse des HbA1c wurde die Ionenaustauschchromatographie an dem G8 HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) Analyzer der Firma TOSOH Bioscience angewandt. Die Bestimmung des HbA1c erfolgt auf Grundlage der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. Sowohl HbA1c als auch die Differenzierung zwischen den einzelnen Hb-Varianten werden dabei untersucht. Das Hämoglobin wird nach Fraktionen aufgetrennt und der prozentuale Anteil am Gesamthämoglobin angegeben. Der G8 HPLC Analyzer ist auf die Referenzmethoden des NGSP und der IFCC rückführbar. Die HbA1c-Ergebnisse werden mit einem VK $\leq 1\%$ ermittelt.

3.7 Referenzwerte

3.7.1 Nüchternplasmaglukose

Die diagnostischen Grenz- bzw. Entscheidungsbereiche der Nüchternplasmaglukose für die Definition einer normalen Stoffwechsellage, eines Prädiabetes und eines manifesten Diabetes mellitus gelten ausschließlich für venöses Plasma und richten sich in der vorliegenden Arbeit nach den aktuellen Empfehlungen und der Praxisleitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft [104].

Tabelle II: Diagnosekriterien zur Beurteilung der diabetischen Stoffwechsellage anhand der Nüchternplasmaglukosekonzentration gemäß den aktuellen Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft [104]

Stoffwechsellage	Nüchternplasmaglukose
normale Nüchternplasmaglukose = kein Diabetes	$< 5,6 \text{ mmol/l}$ ($< 100 \text{ mg/dl}$)
gestörte Nüchternplasmaglukose = Prädiabetes, erhöhtes Diabetesrisiko	$5,6 - 6,9 \text{ mmol/l}$ ($100 - 125 \text{ mg/dl}$)
manifeste Diabetes mellitus	$\geq 7,0 \text{ mmol/l}$ ($\geq 126 \text{ mg/dl}$)

Der Tabelle 2 ist zu entnehmen, dass bei Nüchternplasmaglukosewerten $< 5,6 \text{ mmol/l}$ ($< 100 \text{ mg/dl}$) eine nicht-diabetische Stoffwechsellage vorliegt. Der Bereich für die Definition einer gestörten Nüchternplasmaglukosekonzentration, dem sogenannten Prädiabetes, liegt zwischen $5,6$ bis $6,9 \text{ mmol/l}$ (100 bis 125 mg/dl). Ab einer Nüchternplasmaglukosekonzentration $\geq 7,0 \text{ mmol/l}$ ($\geq 126 \text{ mg/dl}$) muss die Diagnose eines manifesten Diabetes mellitus gestellt werden.

3.7.2 HbA1c

In der Diagnostik eines Diabetes wird neben der Nüchternplasmaglukosemessung auch die Bestimmung des HbA1c durchgeführt [99]. Die diagnostische Stoffwechsellaagebeurteilung orientiert sich in der vorgelegten Arbeit an den aktuellen Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft [104].

Tabelle III: Diagnosekriterien zur Beurteilung der diabetischen Stoffwechsellaage anhand der HbA1c-Konzentration gemäß den aktuellen Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft [104]

Stoffwechsellaage	HbA1c
kein Diabetes	< 5,7 % (< 39 mmol/mol Hb)
Prädiabetes, erhöhtes Diabetes-Risiko	5,7 - 6,4 % (39 - 47 mmol/mol Hb) ¹
manifeste Diabetes mellitus	≥ 6,5 % (≥ 48 mmol/mol Hb)

¹ erhöhtes Diabetes-Risiko; weiterführende Diagnostik mittels Nüchtern-Glukose und oGTT

Die Einteilung der diagnostischen Bereiche nach dem HbA1c-Wert ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Bei einem HbA1c-Messwert von $\geq 6,5 \%$ (≥ 48 mmol/mol Hb) wird die Diagnose eines Diabetes mellitus gestellt. Ein HbA1c $< 5,7 \%$ (< 39 mmol/mol Hb) bedeutet den Ausschluss eines Diabetes. Der Bereich von 5,7 bis 6,4 % (39 bis 48 mmol/mol Hb) definiert Personen mit erhöhtem Diabetesrisiko.

4 ERGEBNISSE

4.1 Analyse der Nüchternglukosekonzentrationen von 53.046 Patienten

Im Rahmen der Studie wurden bei 53.046 Patienten insgesamt 193.899 Glukosebestimmungen durchgeführt. Diese verteilen sich mit 98.054 Messungen auf das Jahr 2014 und mit 95.845 Glukosebestimmungen auf das Jahr 2015.

Bei 77,4 % der Patienten wurde 2014 die Nüchternglukosekonzentration maximal 2-mal im Jahr bestimmt, bei 20 % zwischen 3-bis 4-mal und bei nur etwa 2,6 % mehr als 5-mal pro Jahr. Für das Jahr 2015 ergeben sich nur geringe Unterschiede. Bei 78,2 % aller Patienten wurde maximal 2-malig der Nüchternblutzucker bestimmt. Unverändert zum Vorjahr fanden 3 bis 4 Messungen bei 20 % der Patienten statt und bei 2,2 % der Patienten erfolgten mehr als fünf Bestimmungen (Tabelle 4).

Tabelle IV: Absolute und relative Anzahl an Glukosemessungen in den Jahren 2014 und 2015 bezogen auf das Gesamtkollektiv. Die einzelnen Zeilen beschreiben die jeweilige Anzahl an Patienten und die entsprechende Anzahl der Glukosebestimmungen.

Anzahl der Messungen	Anzahl der Patienten 2014		Anzahl der Glukosebestimmungen 2014		Anzahl der Patienten 2015		Anzahl der Glukosebestimmungen 2015	
pro Jahr	absolut	Prozent	absolut	Prozent	absolut	Prozent	absolut	Prozent
12 - 11	87	0,2	1008	1,0	41	0,1	464	0,5
9 - 10	107	0,2	1008	1,0	121	0,2	1151	1,2
7 - 8	202	0,4	1494	1,5	178	0,3	1306	1,4
5 - 6	983	1,9	5185	5,3	844	1,6	4429	4,6
3 - 4	10.634	20,0	36.743	37,5	10.388	20,0	35.711	37,3
1 - 2	41.033	77,4	52.616	53,7	41.474	78,2	52.784	55,1
	= 53.046		= 98.054		= 53.046		= 95.845	

4.1.1 Vergleich der Nüchternplasmaglukosewerte des Patientengesamtkollektivs vor (2014) und nach (2015) der Umstellung auf mit Citrat versetzte Entnahmebehältnisse

Der Tabelle 5 können die statistischen Kenngrößen für die Nüchternglukosewerte des Gesamtkollektivs für die Jahre 2014 und 2015 entnommen werden: Im Jahr 2014 wurde mit 1,1 mmol/l der niedrigste und mit 43,4 mmol/l der höchste Glukosewert bestimmt. Der Jahresmittelwert der 98.054 Einzelmessungen betrug $6,5 \pm 2,3$ mmol/l (Median 5,9 mmol/l). Für das Jahr 2015 betrug der kleinste gemessene Wert 0,4 mmol/l und der höchste 50,1 mmol/l. Der Jahresdurchschnittswert der 95.845 Glukosekonzentrationen war mit $7,4 \pm 2,5$ mmol/l (Median 6,7 mmol/l) um 14 % höher als der Jahresvorwert.

Tabelle V: Statistische Kenngrößen für die Nüchternglukosekonzentrationen [mmol/l] des Patientengesamtkollektivs in den Jahren 2014 und 2015

	2014	2015	Differenz	
			prozentual	absolut
Anzahl der Nüchternglukosebestimmungen	98.054	95.845		
Minimum	1,1	0,4		
Maximum	43,4	50,1		
Mittelwert	6,5	7,4	14	0,9
Standardabweichung	2,3	2,5		
Median	5,9	6,7		

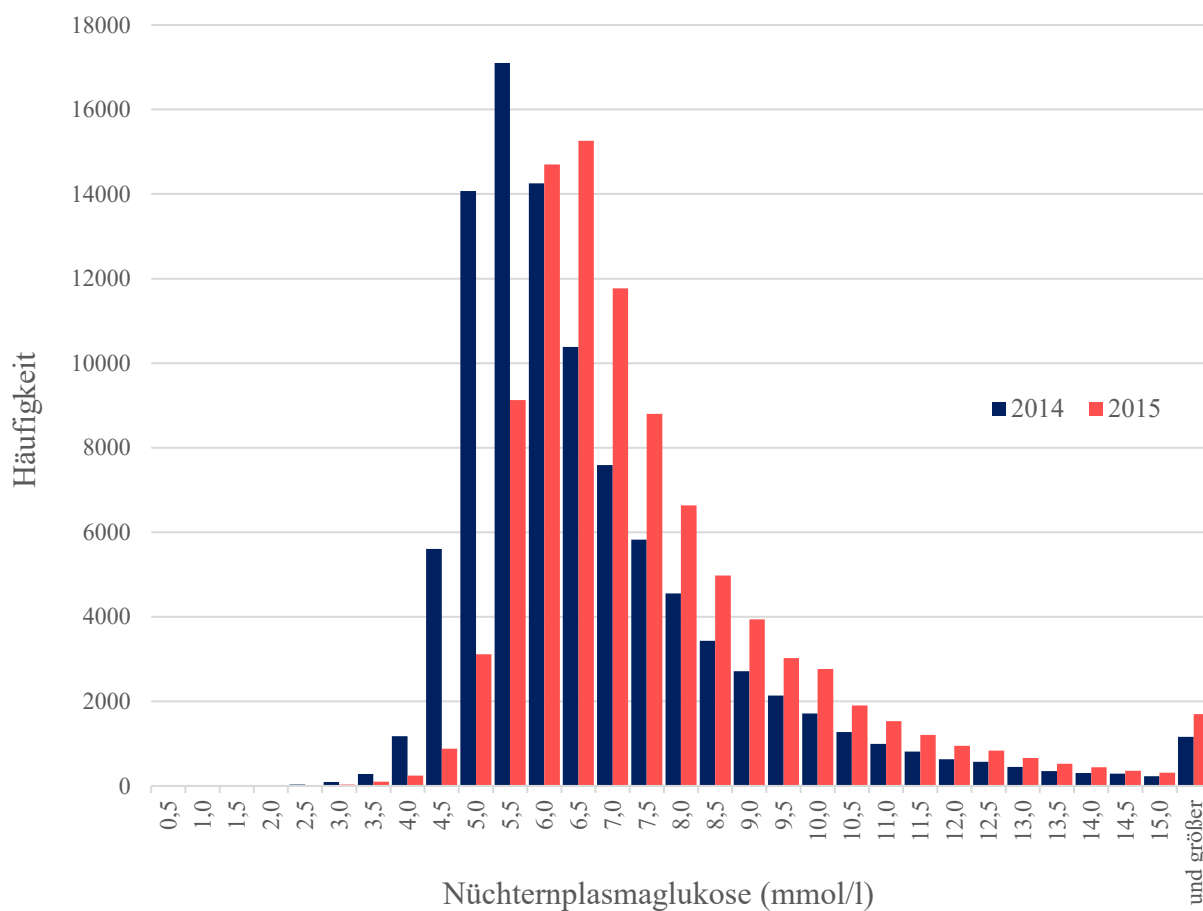


Abb. 7: Absolute Häufigkeitsverteilung der Nüchternplasmaglukosewerte in 0,5-mmol/l-Intervallen in den Jahren 2014 und 2015 für das Gesamtkollektiv [Messwerte für 2014 (n = 98.054): dunkelblaue Balken; Messwerte für 2015 (n = 95.845): rote Balken]

Das Histogramm (Abbildung 7) zeigt die absolute Häufigkeitsverteilung der Nüchternplasmaglukosewerte in 0,5-mmol/l-Intervallen für die Jahre 2014 und 2015.

Im Jahr 2014 (dunkelblaue Balken) liegen insgesamt 61.413 Glukosekonzentrationen (63 %) in einem Wertebereich von 4,0 bis 6,5 mmol/l.

Im Jahr 2015 (rote Balken) befinden sich 59.664 Glukosekonzentrationen (62 %) innerhalb eines Wertebereiches von 5,0 bis 7,5 mmol/l.

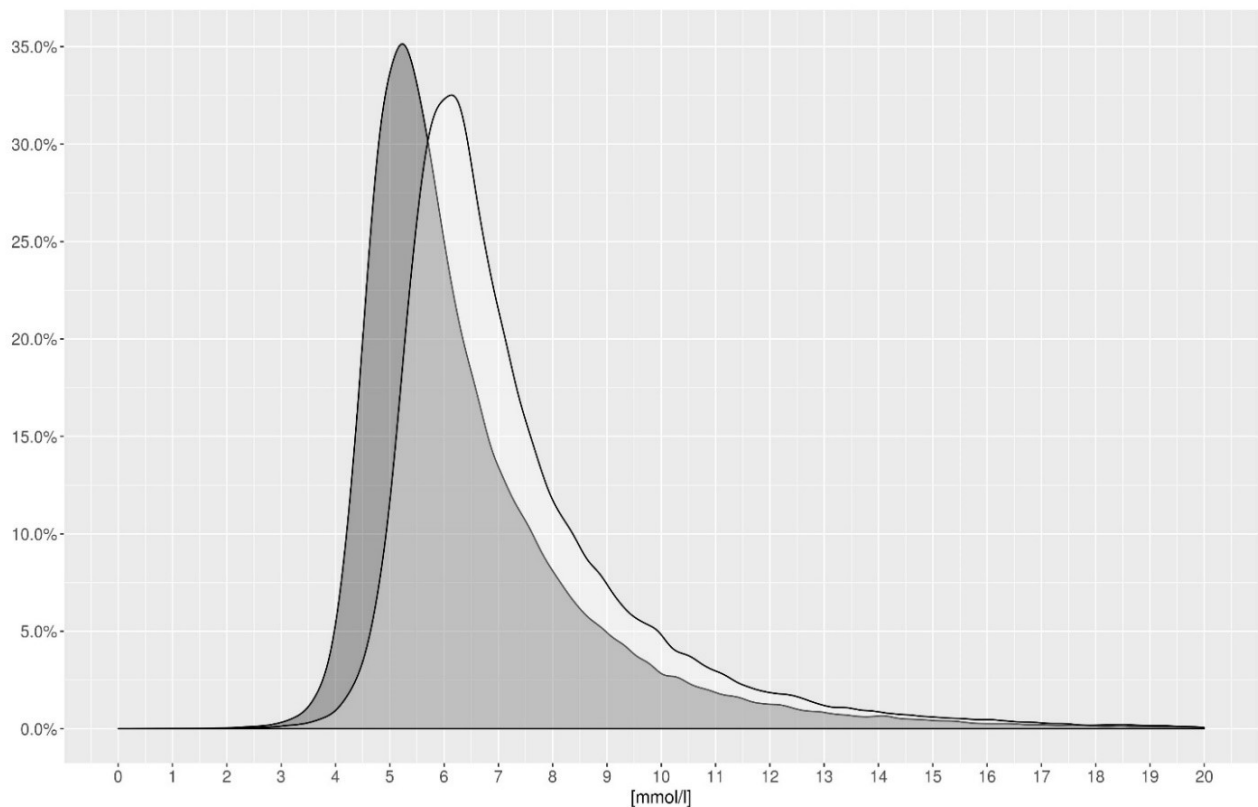


Abb. 8: Relative Häufigkeitsverteilung der Nüchternplasmaglukosewerte der untersuchten Gesamtpopulation in mmol/l für die Jahre 2014 und 2015, dargestellt als sogenannte Kerndichteschätzung
[2014: dunkelgrauer Bereich mit 98.054 Messungen; 2015: hellgrauer Bereich mit 95.845 Messungen; x-Achse: Nüchternplasmaglukosewerte in mmol/l; y-Achse: relative Häufigkeitsverteilung der Nüchternglukosekonzentrationen]

Die Abbildung 8 zeigt die relative Häufigkeitsverteilung der gemessenen Nüchternglukosekonzentrationen für das Jahr 2014 und 2015 dargestellt als sogenannte Kerndichteschätzung. Die dunkelgrau hinterlegte Kurve entspricht der Verteilung der Werte im Jahr 2014. Darüber gelegt ist die hellgraue Kurve mit den Glukosewerten des Jahres 2015.

Die Grafik zeigt für die im Jahr 2015 gemessenen Werte insbesondere in den höheren Wertebereichen eine deutliche Rechtsverschiebung. Am dichtesten verteilen sich die Glukosewerte im Jahr 2014 in dem Wertebereich von etwa 5,0 bis 5,5 mmol/l, während sich für das Folgejahr eine etwas breitere Verteilung der Werte findet mit den meisten Glukosemessungen im Bereich zwischen 5,7 bis 6,5 mmol/l.

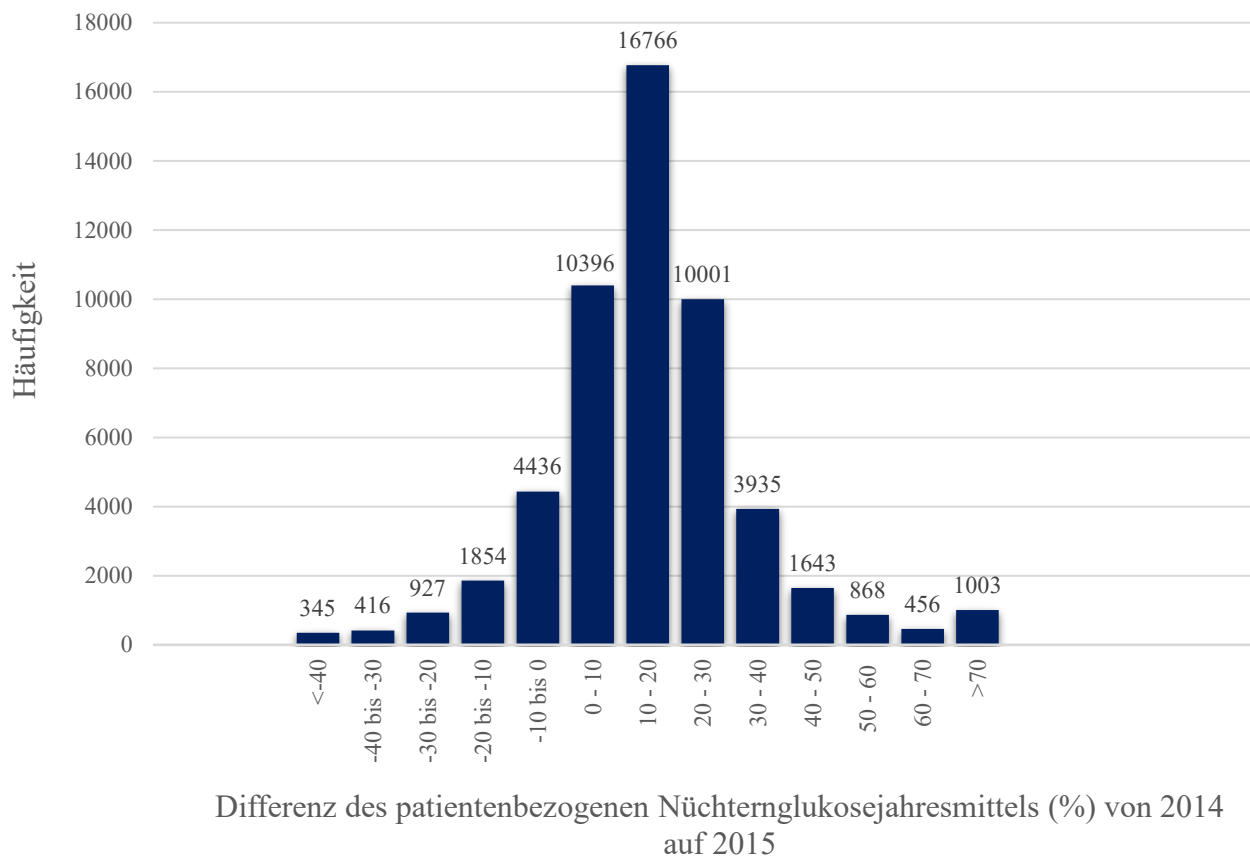


Abb. 9: Absolute Häufigkeitsverteilung der Differenzen der patientenbezogenen Nüchternglukosejahresmittelwerte des Gesamtkollektivs aus 2015 und 2014 in 10-Prozent-Intervallen

Die Abbildung 9 zeigt, wie sich die für den einzelnen Patienten berechneten Jahresmittelwerte der Nüchternglukose von 2014 auf 2015 verändert haben.

Bei 7978 von 53.046 Patienten (15 %) nimmt die Blutzuckerkonzentration im Vergleich zum Vorjahreswert ab. Bei 37.163 Patienten (70 %) wird allerdings eine im Jahresmittelwert bis zu 30% höhere Nüchternglukose gemessen. Bei 7905 Patienten (15 %) war der Anstieg größer als 30%.

4.2 Vergleich der Nüchternglukosekonzentrationen und der HbA1c-Werte von 201 Patienten vor und nach Umstellung der Entnahmesysteme für die Blutzuckermessung

Um die veränderte Wertelage der Nüchternglukose durch die neuen Entnahmeröhrchen und ihre Auswirkungen auf die diabetische Stoffwechsellage im Verlauf zu untersuchen, wurden 201 Patienten ausgewählt, die mindestens 5x jährlich eine BZ-Bestimmung und mindestens 2x jährlich eine HbA1c-Bestimmung erhalten haben (siehe 3.2.2. „Material und Methoden“).

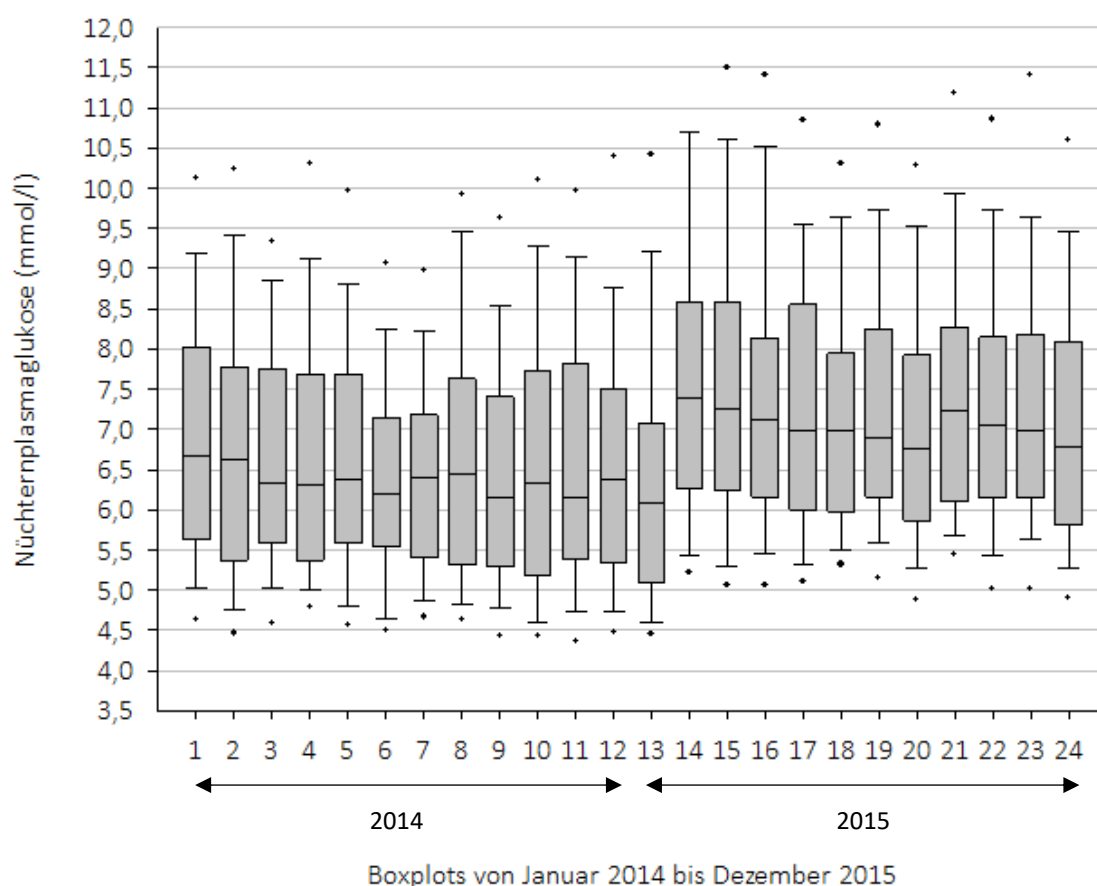
4.2.1 Vergleich der Nüchternglukosewerte

In Tabelle 6 werden die insgesamt 1440 Nüchternglukosewerte aus dem Jahr 2014 den 1372 Messungen des Jahres 2015 gegenübergestellt. Der niedrigste Wert vor der Umstellung der Glukoseröhrchen wurde mit 3,0 mmol/l und der höchste mit 23,9 mmol/l gemessen. Der mittlere Jahreswert betrug 2014 $6,7 \pm 1,7$ mmol/l und der Median lag bei 6,4 mmol/l.

Im Jahr nach der Umstellung wurden Werte von minimal 3,2 mmol/l bis maximal 16,1 mmol/l gemessen. Der arithmetische Mittelwert betrug $7,3 \pm 1,8$ mmol/l und der Median 7,0 mmol/l. Damit ist der Jahresmittelwert der Nüchternglukose nach Einführung der neuen Blutentnahmeröhrchen um 9 % (0,6 mmol/l) angestiegen.

Tabelle VI: Statistische Kenngrößen für die Nüchternglukosekonzentrationen [mmol/l] des Verlaufsstudienkollektives (n = 201) in den Jahren 2014 und 2015

	2014	2015	Differenz	
			prozentual	absolut
Anzahl der Nüchternglukosebestimmungen	1440	1372		
Minimum	3,0	3,2		
Maximum	23,9	16,1		
Mittelwert	6,7	7,3	9	0,6
Standardabweichung	1,7	1,8		
Median	6,4	7,0		



1 01/14; n= 144	7 07/14; n= 150	13 01/15; n= 95	19 07/15; n= 130
2 02/14; n= 113	8 08/14; n= 100	14 02/15; n= 108	20 08/15; n= 101
3 03/14; n= 115	9 09/14; n= 138	15 03/15; n= 125	21 09/15; n= 120
4 04/14; n= 112	10 10/14; n= 125	16 04/15; n= 135	22 10/15; n= 122
5 05/14; n= 116	11 11/14; n= 135	17 05/15; n= 122	23 11/15; n= 98
6 06/14; n= 101	12 12/14; n= 91	18 06/15; n= 113	24 12/15; n= 104

Abb. 10: Nüchtern glukosewerte des Verlaufsstudienkollektivs von Januar 2014 bis Dezember 2015 [01-24: Monate, n= Anzahl der Glukosemessungen im jeweiligen Monat]

In der Abbildung 10 werden die Glukosemessungen von Januar 2014 bis Dezember 2015 für den jeweiligen Monat als Boxplots dargestellt. Die Mediane verteilen sich von Januar (1) bis Dezember 2014 (12) dicht um den Wert 6,4 mmol/l und die Interquartilbereiche (IQR) liegen zwischen 5,2 und 8,0 mmol/l. Die Mediane von Februar (14. Monat) bis Dezember (24. Monat) liegen 2015 auf höherem Niveau und nähern sich einem Wert von 7,0 mmol/l. Die Interquartilbereiche (IQR) reichen von 5,8 bis 8,6 mmol/l und auch die unteren bzw. oberen Whisker liegen 2015 in höheren Wertebereichen. Im Januar 2015, also kurz nach der Umstellung, befinden sich die Wertelagen dagegen noch auf dem Vorjahresniveau, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass die Umsetzung noch nicht flächendeckend umgesetzt worden war.

Die Abbildung 11 veranschaulicht die relative Häufigkeitsverteilung der Nüchternglukosewerte von 201 Patienten für die Jahre 2014 und 2015. Die dunkelgrau hinterlegte Kurve gibt die Verteilung der Werte im Jahr 2014 an. Darüber legt sich der hellgraue Kurvenbereich mit den Werten des Jahres 2015. In der Grafik wird die Rechtsverschiebung der Kurve, in die alle im Jahr 2015 gemessenen Glukosewerte eingegangen sind, deutlich.

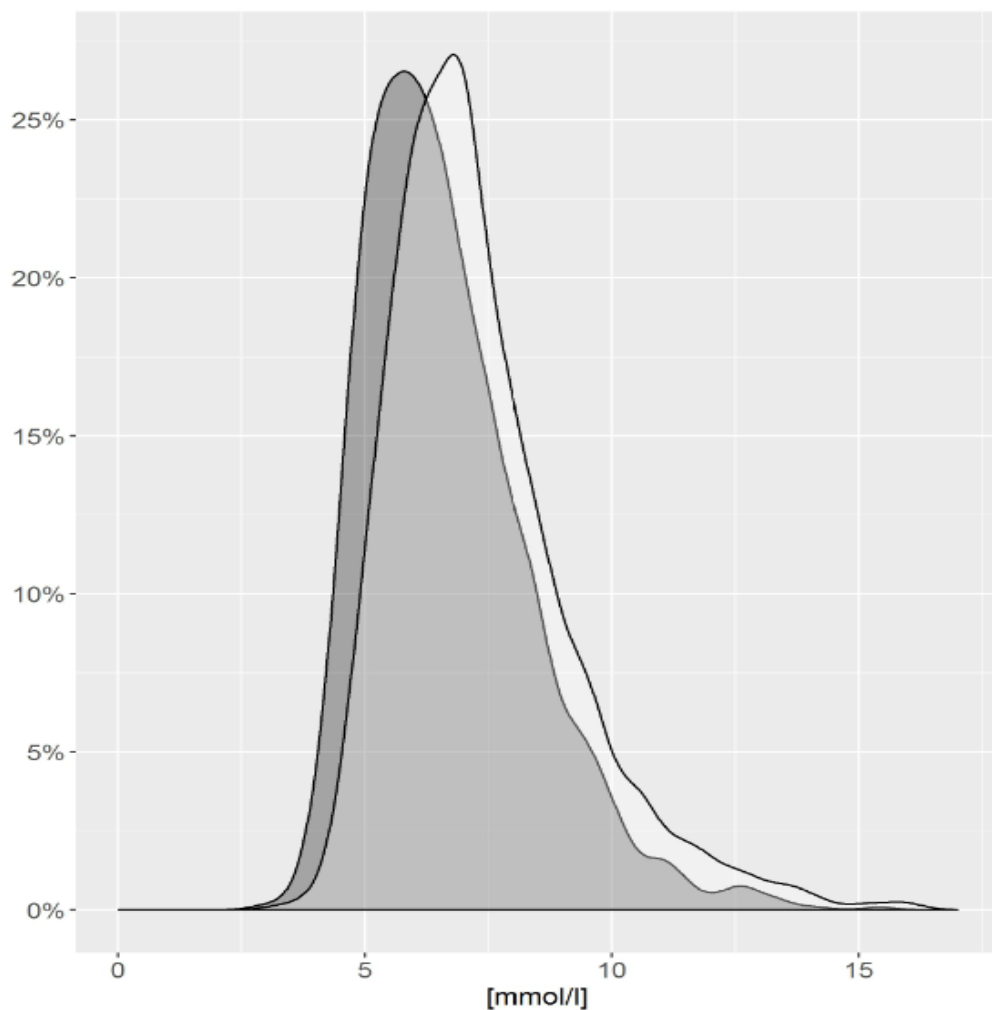


Abb. 11: Relative Häufigkeitsverteilung der Nüchternplasmaglukosewerte der Patienten des untersuchten Verlaufsstudienkollektivs in mmol/l für die Jahre 2014 und 2015, dargestellt als sogenannte Kerndichteschätzung
[2014: dunkelgrauer Bereich mit 1440 Messungen; 2015: hellgrauer Bereich mit 1372 Messungen; x-Achse: Nüchternplasmaglukosewerte in mmol/l; y-Achse: relative Häufigkeit der Nüchternglukosekonzentrationen.]

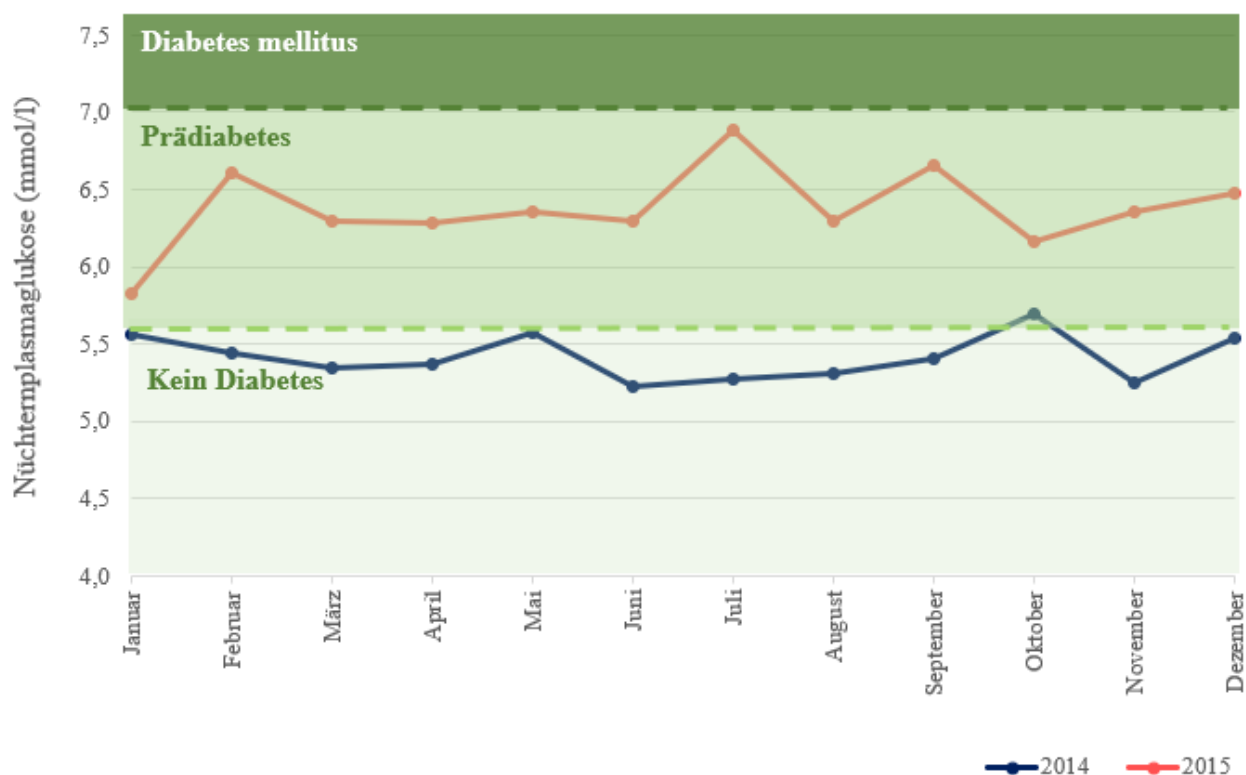


Abb. 12: Exemplarischer Nüchternglukoseverlauf eines anonymisierten Patienten in den Jahren 2014 und 2015 mit farbiger Hinterlegung der Stoffwechselbewertung [Hellgrüner Bereich: < 5,6 mmol/l (kein Diabetes); Grüner Bereich: 5,6 – 6,9 mmol/l (Prädiabetes); Dunkelgrüner Bereich: ≥ 7,0 mmol/l (manifestes Diabetes mellitus). Auf der Grundlage der HbA1c-Diagnosekriterien wird die Stoffwechsellage in beiden Jahren als prädiabetisch eingestuft.]

Die Abbildung 12 veranschaulicht exemplarisch den individuellen Verlauf der Nüchternglukosewerte des anonymisierten Patienten *PräAnaBZ_001* über den gesamten Beobachtungszeitraum. Verfolgt man die Entwicklung der Glukosewerte im Jahr 2014, so fällt ein nahezu konstanter Verlauf mit einer geringen Schwankungsbreite bei Werten zwischen 5,2 bis 5,7 mmol/l auf. Im Jahr 2015 liegen die Glukosewerte in einem höheren Wertebereich zwischen 5,8 bis 6,9 mmol/l, wobei die Glukosekonzentrationen wiederum weitestgehend konstant verlaufen. Da die Blutzuckerwerte im Jahr 2014 bis auf einen Wert im Oktober weniger als 5,6 mmol/l betragen, ergibt sich für den Patienten eine nicht-diabetische Stoffwechsellage. Im Vergleichsjahr 2015 hingegen liegen die Glukosewerte innerhalb der Entscheidungsgrenzen von 5,6 – 6,9 mmol/l, die einer prädiabetischen Stoffwechsellagen entsprechen.

4.2.2 Vergleich der HbA1c-Werte

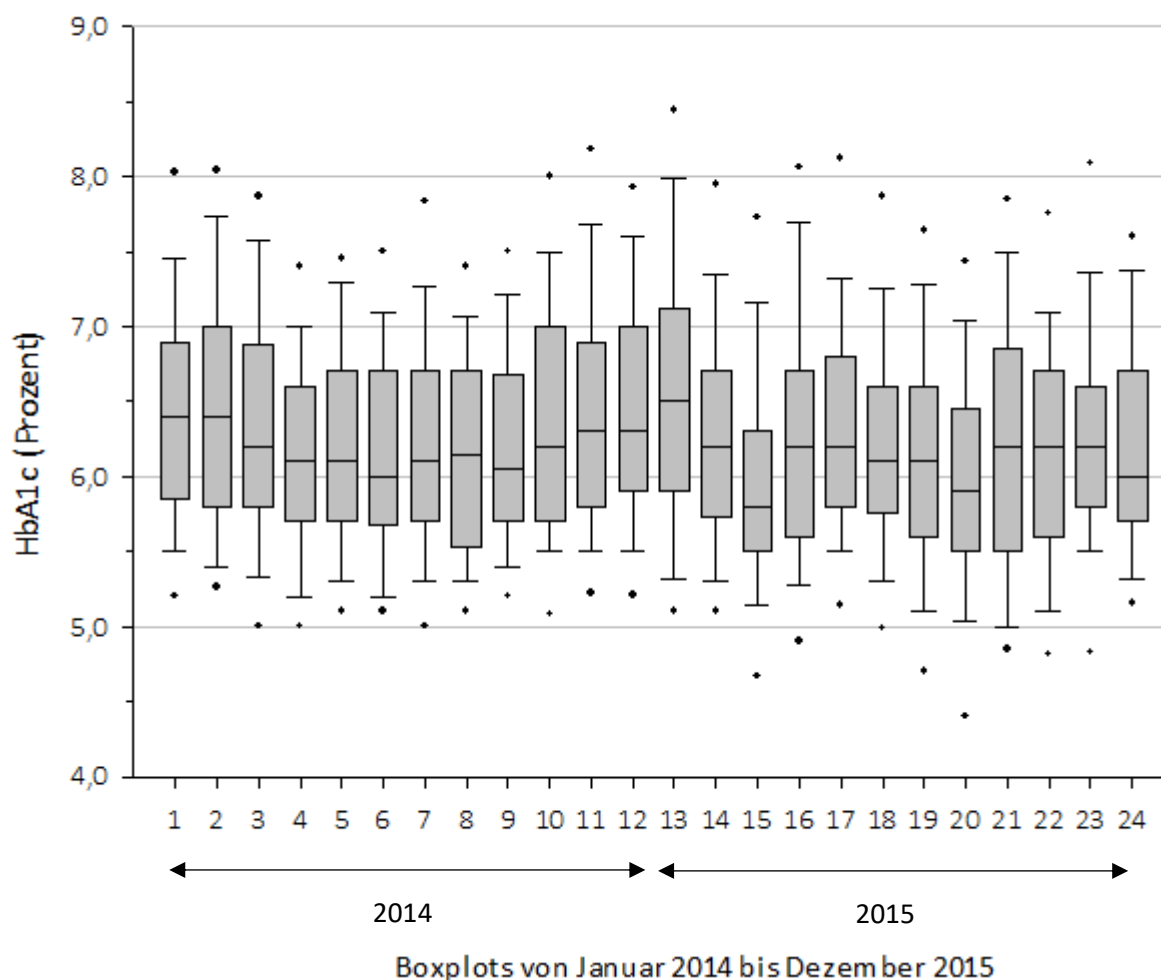
Die gemittelten HbA1c-Werte von 201 Patienten, die während des zweijährigen Erfassungszeitraums bestimmt wurden, sind in Tabelle 7 für 2014 und 2015 getrennt dargestellt. 2014 wurden insgesamt 1172 HbA1c-Bestimmungen erfasst. Der niedrigste Wert wurde mit 4,0 % und der höchste Wert mit 9,5 % bestimmt. Der errechnete Jahresmittelwert beträgt $6,3 \pm 0,8$ % und der Median 6,2 %.

Die Vergleichswerte für das Jahr 2015 weichen davon nur gering ab. Sie umfassen insgesamt 1071 HbA1c-Bestimmungen. Der niedrigste Wert betrug 3,9 % und der höchste 10,6 %. Der Jahresmittelwert wurde mit $6,2 \pm 0,9$ % und der Median mit 6,1 % berechnet. Daraus ergibt sich mit 1,6 % nur eine marginale relative Abweichung des Jahresmittelwertes für 2015 im Vergleich zu 2014.

Tabelle VII: Statistische Kenngrößen für die HbA1c-Werte [%] des Verlaufsstudienkollektives (n = 201 Patienten) in den Jahren 2014 und 2015

	2014	2015	Differenz	
			prozentual	absolut
Anzahl der HbA1c-Messungen	1172	1071		
Minimum	4,0	3,9		
Maximum	9,5	10,6		
Mittelwert	6,3	6,2	1,6	0,1
Standardabweichung	0,8	0,9		
Median	6,2	6,1		

Die Abbildung 13 stellt die HbA1c-Messungen von Januar (01) 2014 bis Dezember 2015 (24) jeweils in Monatsintervallen als Boxplots dar. Bei der Betrachtung fällt auf, dass das Interquartilrange (IQR) im Jahr 2014 zwischen 5,5 und 7,0 % und im Jahr 2015 zwischen 5,5 und 7,1 % liegt und sich somit kaum voneinander unterscheidet. Ähnlich verhält es sich mit Median, Minimal- und Maximalwert, welche sich in dem gesamten Untersuchungszeitraum weitestgehend gleich verteilen.



1 01/14; n= 113	7 07/14; n= 112	13 01/15; n= 110	19 07/15; n= 111
2 02/14; n= 95	8 08/14; n= 92	14 02/15; n= 104	20 08/15; n= 72
3 03/14; n= 92	9 09/14; n= 88	15 03/15; n= 93	21 09/15; n= 89
4 04/14; n= 99	10 10/14; n= 115	16 04/15; n= 107	22 10/15; n= 102
5 05/14; n= 88	11 11/14; n= 91	17 05/15; n= 87	23 11/15; n= 61
6 06/14; n= 94	12 12/14; n= 93	18 06/15; n= 85	24 12/15; n= 50

Abb. 13: HbA1c-Werte des Verlaufsstudienkollektivs von Januar 2014 bis Dezember 2015 [01-24: Monate, n= Anzahl der HbA1c-Messungen]

Die Abbildung 14 zeigt die relative Häufigkeitsverteilung der patientenbezogenen HbA1c-Werte der 201 Patienten in den Jahren 2014 und 2015, dargestellt als Kerndichteschätzung. Die dunkelgrau hinterlegte Fläche unter dem Kurvenverlauf entspricht der Verteilung der Werte im Jahr 2014, die darüber projizierte hellgraue Fläche unter der Kurve den Werten des Jahres 2015. Grafisch lässt sich eine vergleichbare Verteilung der Werte für beide Jahre erkennen.

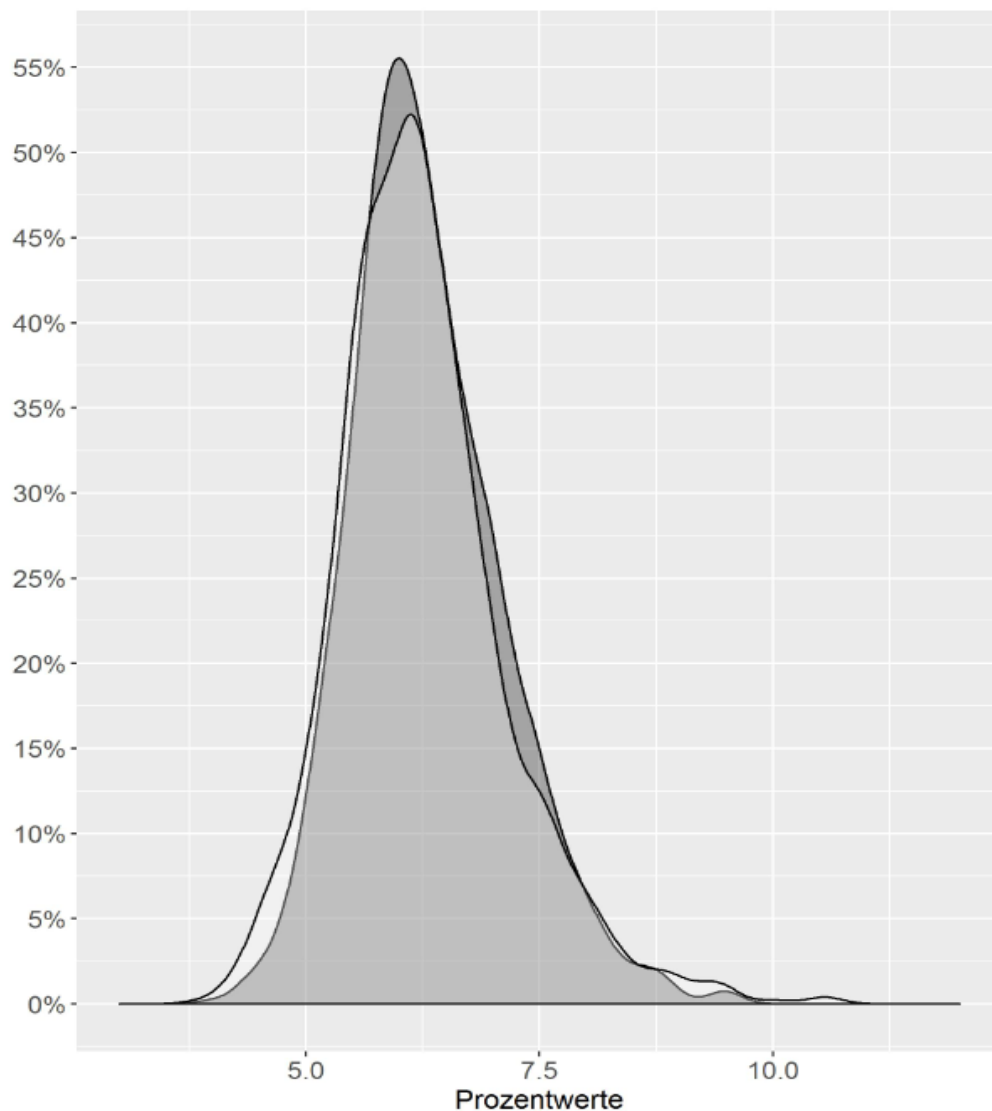


Abb. 14: Relative Häufigkeitsverteilung der HbA1c-Werte der Patienten des untersuchten Verlaufsstudienkollektivs in Prozent für die Jahre 2014 und 2015, dargestellt als sogenannte Kerndichteschätzung
 [2014: dunkelgrauer Bereich mit 1172 Messungen; 2015: hellgrauer Bereich mit 1071 Messungen; x-Achse: HbA1c-Werte in Prozent; y-Achse: relative Häufigkeitsverteilung der HbA1c-Werte]

4.2.3 Statistische Bewertung der Glukose- und HbA1c-Wertelageveränderung in den Jahren 2014 und 2015 des Verlaufsstudienkollektivs

Um zu überprüfen, ob sich die in 2014 und 2015 gemessenen Glukose- und HbA1c-Werte signifikant voneinander unterscheiden, wurden die für jeden Patienten berechneten jährlichen Mittelwerte der 201 Patienten des Verlaufsstudienkollektivs im Folgenden statistisch bewertet:

In Abbildung 15 werden die von 201 Patienten berechneten Mittelwerte der Nüchternglukosebestimmungen aus den Jahren 2014 und 2015 in Form einer Boxplot-Darstellung einander gegenübergestellt. Der Median der Jahresmittelwerte in Höhe von 6,5 mmol/l im Jahr 2014 verschiebt sich im Jahr 2015 mit 7,2 mmol/l in einen deutlich höheren Wertebereich.

Die jeweiligen Interquartilbereiche unterscheiden sich ebenfalls voneinander. Das Interquartilrange (IQR), in welchem sich 50 % der Messwerte befinden, liegt für das Jahr 2014 zwischen 5,5 und 7,6 mmol/l und im Jahr 2015 zwischen 6,3 und 8,3 mmol/l. Die Minimal- und Maximalwerte liegen im Jahr 2015 ebenfalls in höheren Wertebereichen.

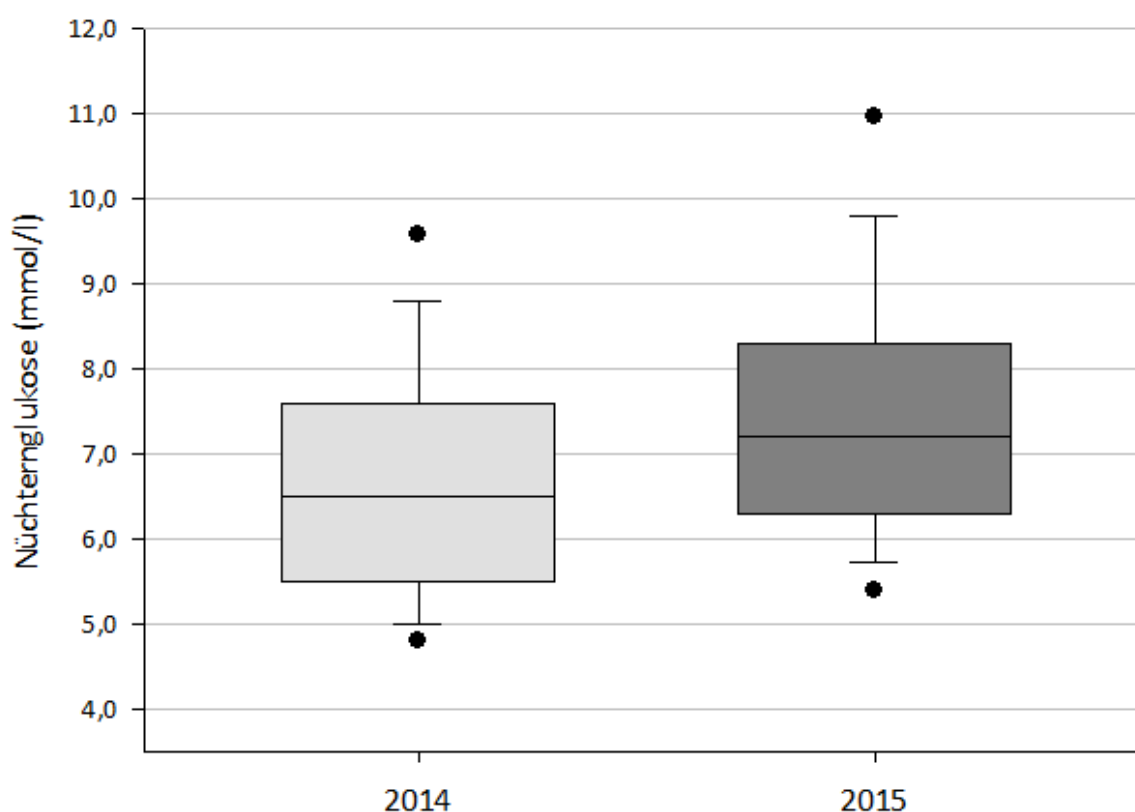


Abb. 15: Vergleich der patientenbezogenen Nüchternglukose-Jahresmittelwerte in mmol/l für die Jahre 2014 und 2015 (n= 201 Jahresmittelwerte)

In der Abbildung 16 sind die patientenbezogenen HbA1c-Jahresmittelwerte von 201 Patienten aus den Jahren 2014 und 2015 als Boxplots dargestellt. Die HbA1c-Konzentrationen liegen 2014 im Mittel bei $6,4 \pm 0,8$ % (Median 6,4%) und im darauffolgenden Jahr bei $6,37 \pm 0,8$ % (Median 6,3 %).

Das Interquartilrange (IQR) liegt für das Jahr 2014 zwischen 5,8 und 6,9 % und für das Jahr 2015 zwischen 5,7 und 6,8 %. Insgesamt hat sich die Wertelage in den Vergleichsjahren nur unwesentlich verändert.

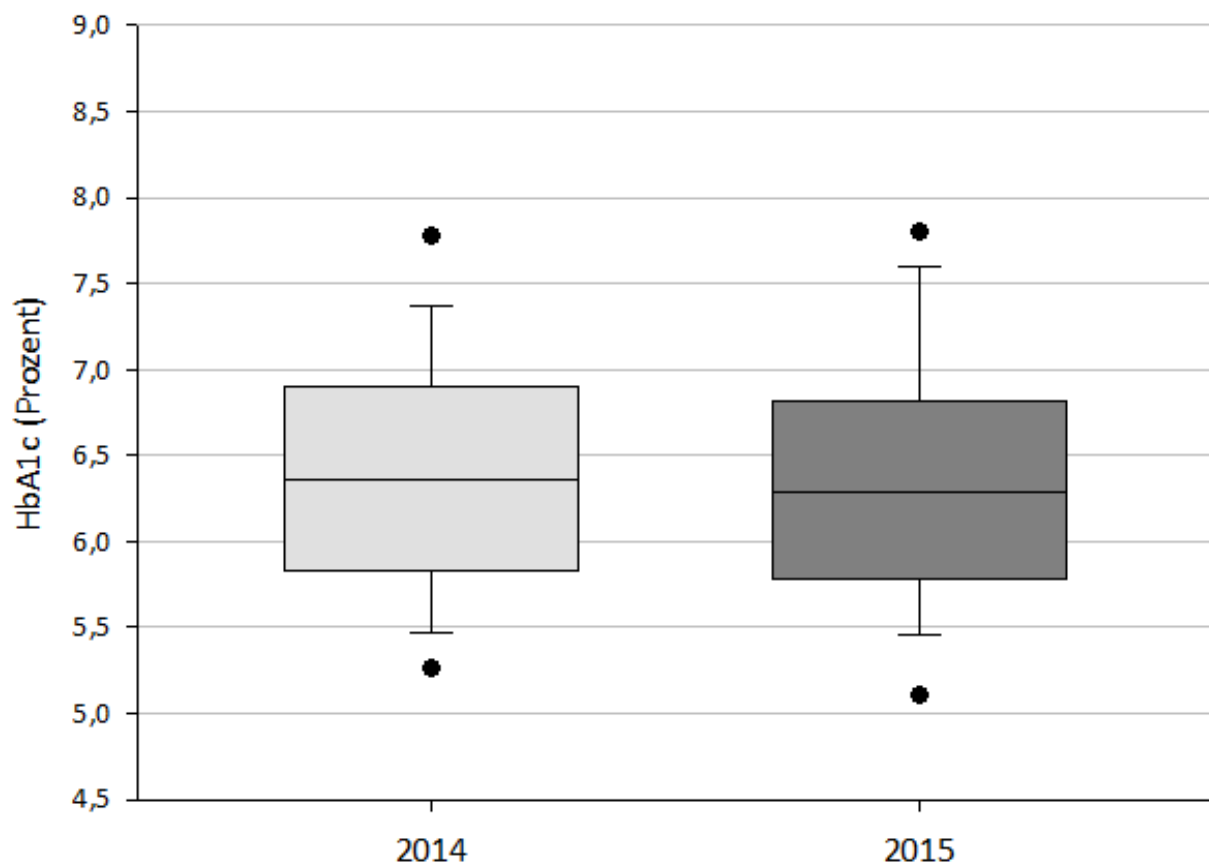


Abb. 16: Vergleich der HbA1c-Jahresmittelwerte des Verlaufsstudienkollektivs in den Jahren 2014 und 2015 (n= 201 Jahresmittelwerte)

Statistische Analyse

Für die Nüchtern glukose-Jahresmittelwerte ergab der Kolmogorov-Smirnov Test eine Normalverteilung der Daten, sodass der paarige t-Test für verbundene Stichproben angewandt wurde. Dieses statistische Verfahren ergab einen $p < 0.001$ für die Differenzen der Nüchtern glukose, was einen statistisch hochsignifikanten Unterschied zwischen den Glukosekonzentrationen in den Vergleichsjahren belegt.

Für die HbA1c-Jahresmittelwerte wurde durch den Kolmogorov-Smirnov Test keine Normalverteilung der Daten festgestellt. Deshalb wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben zur Beurteilung der statistischen Differenz der HbA1c-Konzentrationsunterschiede durchgeführt. Obwohl sich die HbA1c-Konzentrationen 2014 und 2015 nur geringfügig voneinander unterscheiden, ist dieser Unterschied jedoch noch statistisch signifikant ($p = 0.023$).

4.3 Vergleichende klinische Bewertung der diabetischen Stoffwechsellage von 201 Patienten auf der Grundlage veränderter Nüchtern glukosewerte nach Einführung neuer Blutentnahmesysteme mit optimierter Glykolyseinhibition

Um die Auswirkungen der - nach Einführung der neuen Entnahmesysteme - im Mittel um 9 % höher gemessenen Glukosewerte bezüglich einer Veränderung der Einstufung in die unterschiedlichen Stoffwechselbereiche (stoffwechselgesund, prädiabetisch und manifest diabetisch) bewerten zu können, wurden die Jahresmittelwerte des Nüchternblutzuckers der einzelnen Patienten anhand der aktuellen Richtlinien beurteilt [104]. Entsprechend wurde mit den Jahresmittelwerten des HbA1c verfahren, die sowohl 2014 und 2015 methodisch unverändert gemessen worden waren.

4.3.1 Vergleichende Bewertung der diabetischen Stoffwechsellage anhand der Glukosewerte für die Vergleichsjahre 2014 und 2015

Die Kreisdiagramme (Abb. 17a-c) zeigen die prozentuale Verteilung der Patienten auf die unterschiedlichen Stoffwechselkategorien, wenn man die Glukosewerte zugrunde legt.

Die Kategorie „kein Diabetes“ trifft im Jahr 2014 (Abb. 17a) auf 28 % der Patienten zu. Weitere 35 % gelten nach den Richtlinien als Prädiabetiker und bei 37 % liegt ein manifester Diabetes mellitus vor. Die Abbildung 17b zeigt die entsprechende Zuordnung für das Jahr 2015, die auf den Glukosewerten beruht, die aus zusätzlich mit Citrat versetzten Proben gemessen wurden. Von den auch für 2015 kategorisierten 201 Patienten hatten nur 9 % keinen Diabetes, weitere 35 % einen Prädiabetes und 56 % einen manifesten Diabetes mellitus. Insgesamt ist somit der Anteil „stoffwechselgesunder“ Patienten um 19 Prozentpunkte gesunken und der Anteil der Patienten mit einem manifesten Diabetes hat um eben diese 19 Prozentpunkte zugenommen. Obwohl sich, wie in Abbildung 17c dargestellt, der Anteil der Patienten mit einem Prädiabetes quantitativ mit 35 % nicht verändert zu haben scheint, gibt es offensichtlich eine entsprechende Verschiebung innerhalb der Stoffwechselkategorien. So verändert sich die Zuordnung von der nicht-diabetischen in die prädiabetische Stoffwechsellage und von der prädiabetischen in die diabetische Stoffwechselkategorie um jeweils 19 Prozentpunkte.

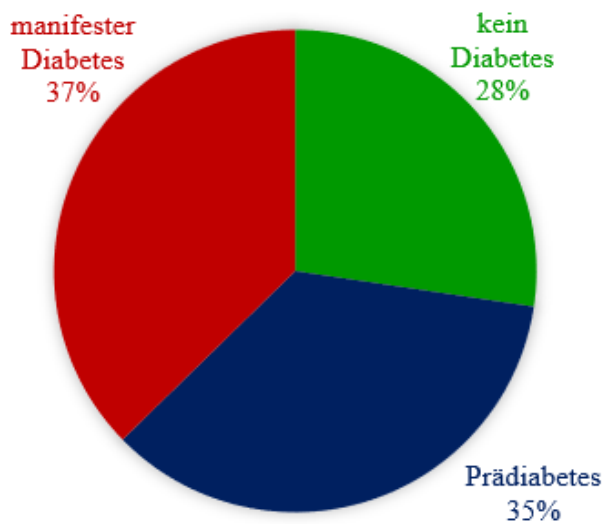


Abb. 17a: Stoffwechsellaage 2014

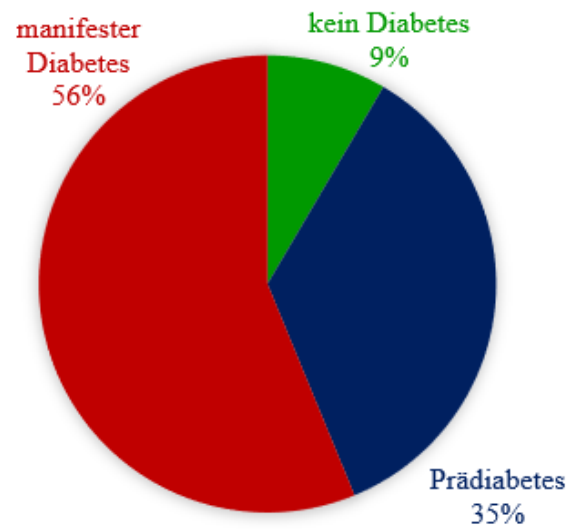


Abb. 17b: Stoffwechsellaage 2015

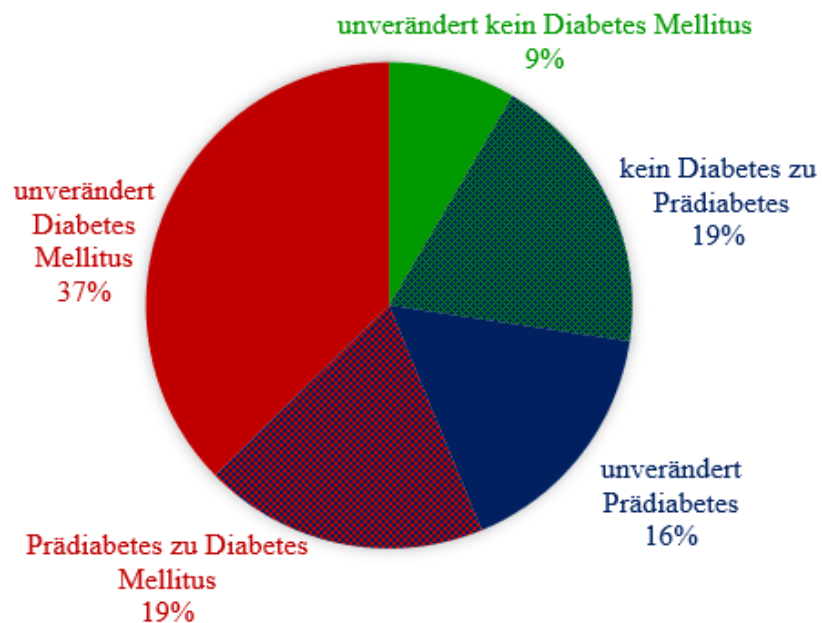


Abb. 17c: Verschiebung der Stoffwechsellaagen

Abb. 17a-c: Kreisdiagramme zur Darstellung der Stoffwechsellaage des Verlaufsstudienkollektivs anhand der Konzentrationen der Nüchternplasmaglukose unter Anwendung der aktuellen Kriterien der Deutschen Diabetes Gesellschaft [104]

4.3.2 Vergleichende Bewertung der diabetischen Stoffwechsellage anhand der HbA1c-Werte für die Vergleichsjahre 2014 und 2015

Der Abbildung 18a-c kann der formale Vergleich der diabetischen Stoffwechsellage für 2014 und 2015 auf der Basis der HbA1c-Diagnosekriterien entnommen werden. Hierfür wurden für jeden Patienten die jährliche mittlere HbA1c-Konzentration berechnet und gemäß den aktuellen Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft [104] bewertet.

Im Jahr 2014 (Abbildung 18a) hatten demnach 16 % der Patienten keinen Diabetes, 37 % eine prädiabetische und 47 % eine manifeste diabetische Stoffwechsellage.

Für 2015 (Abbildung 18b) wurden ein Anteil von 20 % als Nichtdiabetiker, 36 % als Prädiabetiker und 44 % als Diabetiker eingestuft. Demnach zeigt die vergleichende Analyse in den beiden Vergleichsjahren keine wesentliche Veränderung der Zuordnung zu den verschiedenen Stoffwechselkategorien.

Insgesamt hat 2015 der Anteil der Nichtdiabetiker auf Basis der HbA1c Daten, um 4 Prozentpunkte zugenommen, während die Anzahl der Patienten mit einer prädiabetischen Stoffwechsellage um einen und der Anteil der Patienten mit einem manifesten Diabetes mellitus um 3 Prozentpunkte abgenommen haben.

Abbildung 18c veranschaulicht die Verschiebungen innerhalb der Stoffwechselklassen aufgrund der HbA1c-Wertelagen. Es ist zu erkennen, dass die Verschiebung von der prädiabetischen in die nicht-diabetische Stoffwechselklasse (6 %) etwas höher war als die von der nichtdiabetischen in die prädiabetische Stoffwechselkategorie (2 %). Veränderungen der Zuordnung von der prädiabetischen in die manifeste diabetische Stoffwechsellage (5 %), sowie von der manifesten diabetischen in die prädiabetische Stoffwechselklasse (8 %) waren weitgehend gleich.

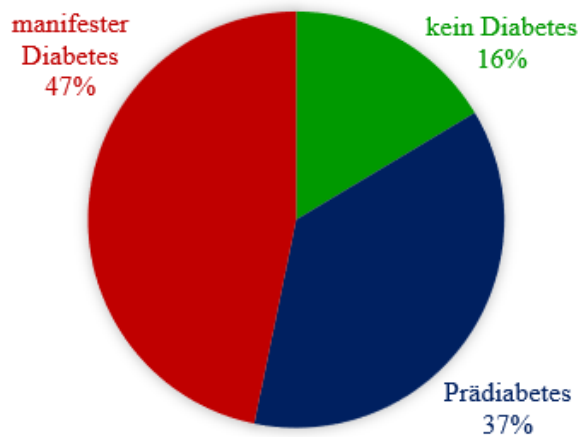


Abb. 18a: Stoffwechsellage 2014

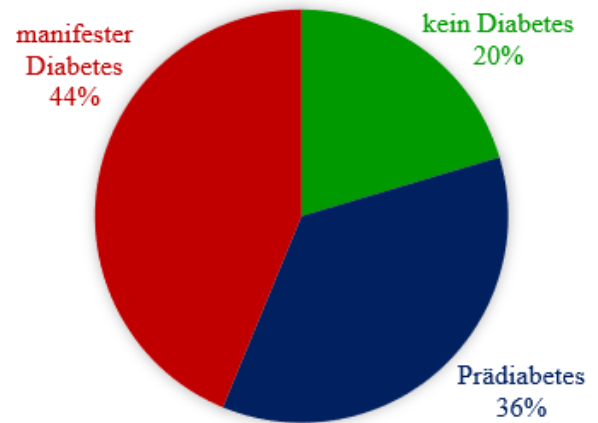


Abb. 18b: Stoffwechsellage 2015

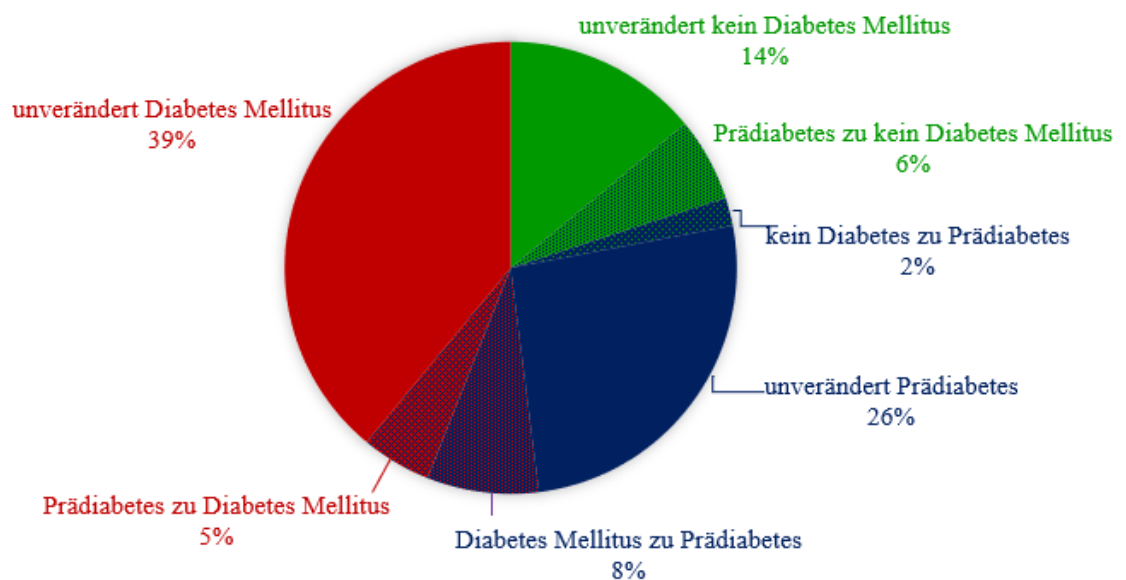


Abb. 18c: Verschiebung der Stoffwechsellagen

Abb. 18a-c: Kreisdiagramme zur Darstellung der Stoffwechsellage des Verlaufsstudienkollektivs anhand der HbA1c-Wertelagen unter Berücksichtigung der aktuellen Kriterien der Deutschen Diabetes Gesellschaft [104]

4.3.3 Vergleichende Stoffwechselbewertung der auf Basis der Glukose- und HbA1c-Werte in den Jahren 2014 und 2015 analysierten 201 Patienten

Die Bewertung der Stoffwechsellage kann sowohl nach den Kriterien der Nüchternplasmaglukose als auch der HbA1c-Wertelage erfolgen. Die Tabelle 8 zeigt die Verteilung der Studienpatienten auf die unterschiedlichen Stoffwechsellagen aufgrund der Bewertung der Blutglukose- und HbA1c-Werte im Jahr 2014 und 2015.

Im Jahr 2014 - vor der Umstellung der Entnahmesysteme - ist der Anteil der aufgrund der Blutzuckerwerte definierten stoffwechselgesunden Patienten offensichtlich um 12 Prozentpunkte höher als ihr Anteil bei Bewertung der HbA1c-Wertelage. Hingegen ist der Anteil der Patienten mit einem manifesten Diabetes mellitus bei Bewertung der Nüchternglukose um 10 Prozentpunkte geringer als der Anteil der Patienten, die gemäß der HbA1c-Werte einem manifesten Diabetes mellitus zugeordnet werden müssen, sofern man die Leitlinien der Diabetesgesellschaft zugrunde legt.

Nach dem Wechsel der Entnahmesysteme wird für das Jahr 2015 deutlich, dass auf Grundlage der Bestimmung der Nüchternglukose 11 Prozentpunkte weniger Patienten einer nicht-diabetischen Stoffwechsellage zugeordnet werden als auf Grundlage der HbA1c-Wertelage. Dafür ist der Anteil der Patienten mit einem manifesten Diabetes mellitus aufgrund der Nüchternglukosebestimmungen um 12 Prozentpunkte größer als der Anteil, der aufgrund der HbA1c-Bestimmung einer manifesten diabetischen Stoffwechsellage zugeordnet werden muss.

Tabelle VIII: Bewertung der Stoffwechsellage der Studienteilnehmer (n=201) im Jahr vor (2014) und nach (2015) der Umstellung der Blutzuckerentnahmesysteme auf Basis von Nüchternglukose- und der HbA1c-Werten

Stoffwechsellage	2014		2015	
	Anteil der Patienten nach den Nüchternglukose-Kriterien	Anteil der Patienten nach den HbA1c-Diagnosekriterien	Anteil der Patienten nach den Nüchternglukose-Kriterien	Anteil der Patienten nach den HbA1c-Diagnosekriterien
kein Diabetes	28 %	16 %	9 %	20 %
Prädiabetes	35 %	37 %	35 %	36 %
manifeste Diabetes mellitus	37 %	47 %	56 %	44 %

Prozentuale Veränderung am Gesamtkollektiv				Prozentuale Veränderung innerhalb der Bewertungsgruppe		
	kein Diabetes	Prädiabetes	manifeste Diabetes	kein Diabetes	Prädiabetes	manifeste Diabetes
Glukose	- 19 %	0 %	+ 19 %	- 69 %	0 %	+ 51 %
HbA1c	+ 4 %	- 1 %	- 3 %	+ 24 %	- 3 %	- 6 %

Tabelle IX: Prozentuale Veränderung der Bewertung der Stoffwechsellaage der Studienteilnehmer (n=201) nach der Umstellung der Blutzuckerentnahmesysteme (2015) auf Basis von Nüchternglukose- und der HbA1c-Werten
[Die drei linken Spalten stellen die prozentuale Veränderung (Zunahme (+) oder Abnahme (-)) der Bewertungsgruppe (kein Diabetes, Prädiabetes, manifeste Diabetes) am Gesamtkollektiv dar. Die drei rechten Spalten stellen die prozentuale Veränderung innerhalb der Bewertungsgruppe dar.]

4.3.4 Exemplarischer Verlauf der Nüchternglukose- und HbA1c-Werte vor (2014) und nach Umstellung (2015) der Glukoseentnahmesysteme mit veränderter Stoffwechselbewertung

Der individuelle Verlauf der Glukose- und HbA1c-Konzentrationen eines von mir analysierten Patienten im Untersuchungszeitraum Januar 2014 bis Dezember 2015, sowie die zugehörige Stoffwechsellaagenbewertung, sind in Abbildung 19 dargestellt. Wie dem blauen Liniendiagramm zu entnehmen ist, zeigt der Glukoseverlauf von Januar bis Dezember 2014 relativ konstante Werte zwischen 5,0 bis 5,4 mmol/l. Im Februar 2015 werden aufgrund der Umstellung der Entnahmesysteme höhere Blutzuckerwerte bis zu 6,0 mmol/l gemessen. In den Folgemonaten liegen die Werte zwischen minimal 5,6 mmol/l und maximal 6,5 mmol/l auf einem insgesamt höheren Wertenniveau.

Betrachtet man den 24-monatigen Verlauf der HbA1c-Konzentrationen so fällt auf, dass die Wertelage in diesem Zeitraum nahezu konstant bleibt. Im Jahr 2014 liegen die HbA1c-Werte zwischen 5,7 bis 6,3 % und im Jahr 2015 zwischen 5,8 und 6,4 %. Nach den Bewertungskriterien für die Nüchternplasmaglukose ist für den Patienten im Jahr 2014 eine nicht-diabetische Stoffwechsellaage anzunehmen. Im Jahr 2015 hingegen muss aufgrund der höher gemessenen Glukosewerte die Stoffwechsellaage als „prädiabetisch“ bewertet werden.

Die Beurteilung der Stoffwechselsituation nach den für das HbA1c geltenden Kriterien hat sich dagegen über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht verändert.

Da alle HbA1c-Werte zwischen 5,7 und 6,4 % gemessen werden, liegt bei dem Patienten über den gesamten Zeitraum eine prädiabetische Stoffwechsellaage vor.

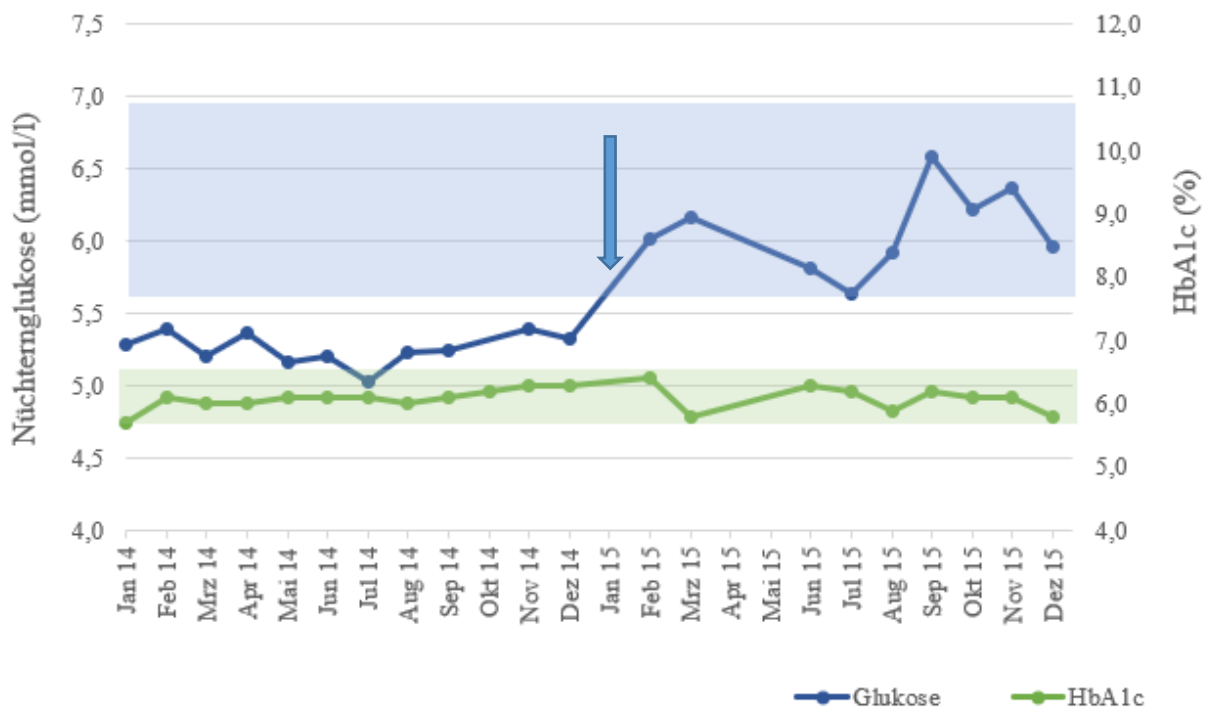


Abb. 19: Nüchtern glukose- und HbA1c-Verlauf eines anonymisierten Patienten mit farbiger Hinterlegung der Stoffwechselbewertung. [Dunkelblaue Linie: Glukosewerte, Grüne Linie: HbA1c-Werte. Der Pfeil weist auf den Zeitpunkt der Umstellung der Abnahmesysteme hin. Blauer Bereich: 5,6 – 6,9 mmol/l Glukose (Prädiabetes); Grüner Bereich: 5,7 – 6,4 % HbA1c (Prädiabetes)]

5 DISKUSSION

Man hat es in Deutschland lange Zeit als ausreichend betrachtet, den nach der Blutentnahme durch die noch vitalen Blutzellen - insbesondere den Erythrozyten bedingten - fortgesetzten Verbrauch von Glukose aus dem Plasma (sog. „in vitro Glykolyse“) durch den Zusatz von Natriumfluorid zu unterbinden. Damit verband sich die Hoffnung, dass die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Blutentnahme gemessenen Glukosekonzentrationen in etwa der in vivo Situation entsprechen. Eine solche, der in vivo Situation nahekommende Blutzuckermessung ist eine notwendige Voraussetzung für die Diagnosestellung eines Diabetes mellitus, für die Erfassung von Risikopatienten und für eine rechtzeitige ausreichende Behandlung beziehungsweise für eine optimale Einstellung des Blutzuckers, um Folgeschäden zu vermeiden.

Der Blutzuckerwert sollte aus venösem Vollblut bestimmt werden. Dem Goldstandard entsprechend muss die Vollblutprobe innerhalb von 15 Minuten zentrifugiert, das zellfreie Plasma abpipettiert und gekühlt gelagert werden. Die Messung aus dem venösen Plasma sollte innerhalb von 24 Stunden erfolgen. Wenn die Messung z.B. aus Forschungs- oder Studiengründen zu einem späteren Zeitpunkt im medizinischen Labor erfolgen soll, so muss die Probe bis zur Messung eingefroren werden [81–83]. Diese Art der präanalytischen Probenbehandlung bleibt allerdings in der Regel Krankenhäusern und Ambulanzzentren mit einem Präsenzlabor vorbehalten. Im hausärztlichen Einsendebereich ohne Möglichkeit der Zentrifugation und des gekühlten Transports hat die präanalytische in vitro Glykolyse Einfluss auf das Messergebnis. Die Geschwindigkeit des anaeroben Glukoseabbaus in einer Blutprobe variiert bei Lagerung unter Raumtemperatur und geht mit einem Glukosekonzentrationsabfall zwischen 5 und 7 % pro Stunde (ca. 0,6 mmol/l/h) einher. Präanalytische Einflussgrößen wie eine erhöhte Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, sowie die Umgebungstemperatur und Lagerungszeit nach der Blutentnahme bis zur Analyse im Labor, beeinflussen die Glykolyse in unterschiedlichem Ausmaß [105–108]. Deshalb ist insbesondere im ambulanten Bereich neben der sofort einsetzenden auch eine lang anhaltende Wirkung von zugesetzten Glykolyseinhibitoren für eine korrekte Blutzuckerbestimmung von entscheidender Bedeutung, zumal zwischen Blutentnahme und Messung meist nicht immer einfache Transport- und Lagerungsbedingungen (Umgebungstemperatur) bestehen.

Die Glykolyse läuft in zehn definierten Schritten ab, so wie es in der Einleitung beschrieben wurde.

Natriumfluorid wurde jahrzehntelang kritiklos als alleiniger Zusatz zur Glykolyseinhibition empfohlen, obwohl schon 1941 Bueding und Goldfarb aufgrund eigener Untersuchungen darauf hinwiesen, dass die Hemmung der Glykolyse durch Natriumfluorid innerhalb der ersten vier Stunden nach Blutentnahme unzureichend ist [109]. Dennoch ging Natriumfluorid als Glukosestabilisator der Wahl in nationale und internationale Leitlinien und Empfehlungen ein [110–112].

Natriumfluorid wirkt als kompetitiver Inhibitor der Enolase, dem Enzym des neunten Reaktionsschrittes der Glykolyse. Die Enolase ist ein Metalloenzym und benötigt Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor. Es katalysiert die reversible Dehydratation von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat. Der hemmende Effekt von Natriumfluorid beruht darauf, dass es einen Komplex mit anorganischem Phosphat und Magnesium auf der aktiven Seite des Enzyms bildet. Dieser Magnesium-Fluorid-Phosphat-Komplex blockiert den Zugang für das 2-Phosphoglycerat und unterbindet die katalytische Aktivität des Enzyms [113, 114]. Obwohl die Hemmung der Enolase innerhalb von 5 Minuten im Probengefäß einsetzt, können alle übergeordneten acht Reaktionsschritte bis zur Enolase-Inhibition weiter ablaufen. Die Glukosemetabolisierung bis zum 2-Phosphoglycerat - einschließlich der ATP gekoppelten Glukosephosphorylierung durch die Hexokinase und Phosphofruktokinase, sowie der Substratkettenphosphorylierung durch die 3-Phosphoglyceratkinase - wird nicht unterbrochen. Die Glykolyse hält so lange an, bis ein chemisches Gleichgewicht in der Zelle entstanden ist [115]. Dabei spielt die Hemmung der Hexokinase durch das Reaktionsprodukt Glukose-6-Phosphat (G-6-P) in physiologischer Konzentration eine wichtige Rolle, indem G-6-P das Enzym im Sinne einer allosterischen Rückkoppelung hemmt. Zum anderen hemmt der ATP-Anstieg - durch die 3-Phosphoglyceratkinasereaktion - die Phosphofruktokinase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse, allosterisch. Folglich kommt die Glykolyse erst nach einer gewissen Zeit zum Erliegen [116]. Eine solche verzögerte Glykolysehemmung führt nach der Blutentnahme zu einem kontinuierlichen Verlust der Glukose im Entnahmeröhrchen, wie in zahlreichen Studien bestätigt wurde [74].

Chan et al. haben schon 1989 berichtet, dass der Glukosekonzentrationsabfall im Natriumfluoridröhrchen mit 4,2 % am stärksten innerhalb der ersten Stunde nach der Blutentnahme ausfällt [117]. Gambino et al. stellen unter alleinigem Natriumfluoridzusatz einen Abfall des Blutzuckers von 4,6 % in 2 Stunden und 7 % in 24 Stunden fest [45]. Peake et al. haben eine Hemmung der Glykolyse durch Natriumfluorid erst nach 4 Stunden nachweisen können [73].

Roccaforte et al. zeigen, dass die Glukosekonzentration im Natriumfluorid-Röhrchen nach 2,5 Stunden im Vergleich zur Glukosekonzentration im sofort zentrifugierten Entnahmeröhrchen um 6 % abfällt und Juricic et al. beschreiben einen Abfall der Glukose von 5,6 % in der ersten Stunde und von 8,0 % nach 3 Stunden in Natriumfluoridröhrchen ohne Citratzusatz [118, 119].

Wissenschaftliche Belege zur Effektivität der Glykolysehemmung durch Ansäuerung des Blutes liefern Uchida et al., die 1988 eine Studie über die sofortige Glykolyseinhibition durch Azidifizierung des Blutes durch ein Gemisch aus Zitronensäure (3,4 mg/ml), Na₃-Citrat (1,6 mg/ml), Na₂-EDTA (4,8 mg/ml) und Natriumfluorid (0,2 mg/ml Blut) veröffentlicht haben. In ihren Untersuchungen fanden sie heraus, dass durch die Absenkung des pH-Wertes die Blutglukose über 8 Stunden konstant bleibt und erst nach 24 Stunden eine geringe Abnahme von $0,07 \pm 0,06$ mmol/l ($1,3 \pm 1,1$ mg/dl) zu messen ist [85]. Das citrathaltige Gemisch führt schon zu Beginn der in vitro Glykolyse zu einer sofortigen Hemmung des Glukoseabbaus in den Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Der Citratzusatz bewirkt durch Absenkung des pH-Wertes im Probengefäß eine Hemmung der pH-abhängigen Aktivität der Hexokinase und der Phosphofruktokinase, die wichtige Schrittmacherenzyme im ersten und dritten Reaktionsschritt der Glykolyse [32] sind. Beide Enzyme haben ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 8,4 – 8,6. Mit fallendem pH-Wert im Umgebungsmilieu sinkt die katalytische Aktivität der beiden Enzyme und somit auch die Geschwindigkeit der Glykolyse. Die bereits erwähnte Arbeitsgruppe von Uchida und Mitarbeitern zeigten, dass bei einem pH von 7,0 die Aktivität der Hexokinase auf 10 % und die der Phosphofruktokinase auf 30 % sinkt. Eine vollständige und sofortige Inaktivierung der Enzyme tritt bei einem pH-Wert von 5,3 – 5,9 auf. Durch die Hemmung der Hexokinase und Phosphofruktokinase allein durch Citrat kommt die Glykolyse sofort zum Erliegen. Dieser inhibierende Effekt wird für etwa 10 Stunden bei 25°C aufrechterhalten, später lässt der Effekt der pH-Absenkung nach und die Enzymaktivität nimmt langsam wieder zu. Aus diesem Grund wird neben Citrat noch zusätzlich Natriumfluorid zur zwar verzögert einsetzenden aber längerfristig stabilisierend wirkenden Glykolyseinhibition zugesetzt [85, 120]. Gambino et al. kommen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass die Kombination von Natriumfluorid und Citrat den in vitro Blutglukoseabfall auf 0,3 % nach 2 Stunden und auf 1,2 % nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur begrenzt [45]. Fobker berichtet über einen Abfall der Blutglukose in verschiedenen mit Citrat versetzten Entnahmeröhrchen in Höhe von 2,2 % bei einer Lagerung über 24 Stunden [121]. In den Studien von Juricic et al. wurde nach 3 Stunden lediglich ein klinisch nicht relevanter Abfall der Nüchternplasmaglukose in Höhe von 1,6 % gemessen, was mit Untersuchungen von del Pino et al. übereinstimmt [119, 122].

Winter et al. können in ihrer Studie [123] die Langzeitstabilität der Glukose im Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen bei Raumtemperatur und unter Transportbedingungen mit einem geringen durchschnittlichen Glukoseabfall von 0,03 mmol/l in 96 Stunden belegen.

Einführung und Auswirkung neuer Blutentnahmesysteme mit optimierter Glykolysehemmung

Die Leitlinie zum Gestationsdiabetes, die von der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) in Zusammenarbeit mit der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) im August 2011 publiziert wurde, löste eine intensive Diskussion bezüglich einer effektiven Verhinderung der in vitro Glykolyse aus [82]. Darin fordern die DDG und DGGG, dass Natriumfluorid allein zur Glykolysehemmung nicht mehr eingesetzt werden soll. Stattdessen wird empfohlen, einen für die frühe Glykolyse geeigneten Glykolysehemmer wie Citratpuffer - flüssig oder als Trockensubstanz in adhäsiver Gelform - zusätzlich zu Natriumfluorid zu verwenden, damit durch die Ansäuerung der Probe im Entnahmeröhrchen die Glykolyse sofort und nicht erst nach etwa 4 Stunden gehemmt wird [83, 124].

Die Markteinführung von Natriumfluorid/Citrat-Entnahmesystemen erfolgte in Europa bereits ab 1996, zunächst in Finnland, 2003 in Dänemark, 2005 in Polen und 2007 dann in Schweden [122, 124]. Seit 2011 wird dieses Verfahren auch in den gemeinsamen Leitlinien der Amerikanischen Gesellschaft für Klinische Chemie (AACC) und der Amerikanischen Diabetesgesellschaft (ADA) empfohlen [49]. In Deutschland führte die generelle Verfügbarkeit von acidifizierten Natriumfluorid-Entnahmesystemen nach inoffiziellen Informationen verschiedener Hersteller - trotz der 2011 veröffentlichten Leitlinie – lange nicht zu ihrem flächendeckenden Einsatz. Daher forderten die Deutsche Diabetes Gesellschaft und die Arbeitsgemeinschaft Diabetologische Technologie (AGDT) im August 2014 in einer erneute Stellungnahme nachdrücklich, den Einsatz von Blutentnahmeröhrchen, die nur Natriumfluorid als Glykolyseinhibitor enthalten, einzustellen und die Verwendung ungeeigneter Blutentnahmesysteme zu unterlassen [125]. Inzwischen wird die Verwendung solcher Systeme auch von der Deutschen Zertifizierungs- und Akkreditierungsstelle (DAkkS) und in der Praxisleitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft gefordert [30, 81, 104].

Am 01.01.2015 führte man - aufgrund der genannten Empfehlungen der DDG - am MVZ der Medizinisch-Diagnostischen Institute GmbH die neuen mit Citrat angesäuerten Entnahmeröhrchen zur Glukosebestimmung bei allen Patienten, nicht nur bei Schwangeren ein. Zuvor wurden ausschließlich nur mit Natriumfluorid stabilisierte Probengefäße verwendet.

Nach Umstellung der Entnahmesysteme kam es seitens der Anwender aus den Einsendepraxen zunehmend zu Nachfragen wegen der nun vermeintlich erhöht gemessenen Blutzuckerwerte bei den Patienten. Hierbei stand die Frage nach der richtigen Interpretation der Ergebnisse im Vordergrund.

Ziel meiner retrospektiv über 2 Jahre durchgeführten Untersuchungen war es, die zum Jahreswechsel 2014 / 2015 eingeführten und bezüglich der Inhibition der in vitro Glykolyse optimierten Entnahmesysteme mit den im Jahr 2014 nur mit Natriumfluorid versetzten Systemen zu vergleichen. Hierdurch sollten die aufgrund der verbesserten Glykolyseinhibition höher gemessenen Glukosewerte mit den vorher gemessenen Werten verglichen werden. Die Auswertung der HbA1c-Werte sollte Aufschluss über die Güte der Blutzuckereinstellung der untersuchten Patienten geben. Letztlich galt meine besondere Aufmerksamkeit der Auswirkung einer veränderten Glukosewertelage auf die Bewertung der Stoffwechselsituation der Patienten.

Die Untersuchungen an 53.046 Patienten zeigen, dass in den mit Citrat angesäuerten Röhrchen höhere Blutzuckerwerte gemessen werden als in den Natriumfluoridröhrchen vor der Umstellung. Die um 14 % in den Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen höher gemessenen Glukosekonzentrationen entsprechen in etwa den im Jahr 2014 durchgeführten Untersuchungen von Norman und Jones. Sie werteten Nüchternplasmaglukosewerte eines Kollektivs von 33.091 Patienten im Zeitraum von 2007 bis 2012 aus. Bis zum September 2010 wurden nur mit Natriumfluorid versetzte Entnahmesysteme für die Blutzuckeranalytik verwendet, bevor mit Citrat angesäuerte Probengefäße benutzt wurden. Ihre Ergebnisse erbrachten ebenfalls eine um 14 % höher gemessene Glukosekonzentration bei Verwendung von Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen [126]. In einer weiteren Studie werteten Ridefelt et al. 460.751 Blutzuckermessdaten aus, die von 2008 bis 2013 erhoben wurden. Die Umstellung von Natriumfluorid auf Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen erfolgte dabei im November 2010. Im Ergebnis dieser Untersuchung wurden ebenfalls nach der Einführung der Natriumfluorid/Citratröhrchen höhere Glukosewerte gemessen. Der Anstieg der gemessenen Glukosewerte fällt allerdings mit nur 4 %, im Vergleich zu meinen Beobachtungen, deutlich geringer aus [127]. Der Unterschied mag daran liegen, dass die von mir ausgewerteten Messwerte aus Proben von unterschiedlichen Einsendern (Praxen und Kliniken) mit unterschiedlicher zeitlicher Distanz zum Untersuchungslabor stammten. Es ist daher anzunehmen, dass die Transportzeit, insbesondere bei Verwendung der nicht mit Citrat versetzten Entnahmeröhrchen, einen Einfluss auf die Glukosekonzentrationen hatte.

Weitere Einflussfaktoren wie eine andere Alters- und Geschlechtsverteilung, sowie die Compliance der Patienten können diesen Unterschied ebenso bewirkt haben.

Um zu untersuchen inwieweit die, durch die nach Einführung der neuen citatgepufferten Entnahmeröhrchen, höher gemessenen Glukosewerte Auswirkungen auf die Bewertung der diabetischen Stoffwechsellage hatten, wurde (wie unter Material und Methoden beschrieben) ein Verlaufsstudienkollektiv definiert. Durch zusätzliche Analyse der HbA1c-Werte sollte ausgeschlossen werden, dass die erhöht gemessenen Glukosewerte auf eine generell veränderte Stoffwechsellage zurückzuführen sind. Auch sollte untersucht werden inwieweit die Beurteilung der Stoffwechsellage nach den Leitlinien für die Bewertung von Nüchternplasmaglukose oder von HbA1c nach Umstellung der Entnahmesysteme einander entsprechen oder voneinander abweichen.

Die Messungen an den 201 Patienten des sogenannten Vergleichskollektivs ergaben für das Jahr 2014 einen Jahresmittelwert der Nüchternglukose in Höhe von 6,7 mmol/l und nach Umstellung in Höhe von 7,3 mmol/l. Dieser Anstieg der höher gemessenen Glukosewerte von 9 % fällt geringer aus als beim analysierten Gesamtkollektiv mit 53.046 Patienten. Dieser Unterschied erklärt sich wohl dadurch, dass das Verlaufskollektiv von Ausreißer- und Extremwerten bereinigt wurde.

Wie den Boxplotdarstellungen in Abbildung 10 zu entnehmen ist, werden höhere Glukosekonzentrationen vor allem ab Februar 2015 deutlich. Im Januar entspricht die Werteverteilung weitestgehend denen aus den Vormonaten Ende 2014. Dies ist vermutlich durch die Einführung der Röhrchen im Januar und einer zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig flächendeckenden Anwendung der Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen zu erklären. Ab Februar 2015 lässt sich die höhere Wertelage über die Folgemonate konstant nachweisen.

Ein Patientenbeispiel (Abbildung 12) lässt die Wertelageänderung der Nüchternglukose für die Jahre 2014 und 2015 nachvollziehen. Die höhere Wertelage der im Jahr 2015 gemessenen Glukosewerte führt zu einer veränderten Bewertung der Stoffwechsellage: Aufgrund der nach der Einführung der neuen Entnahmesysteme erhöht gemessenen Glukosewerte muss die Bewertung der Stoffwechsellage bei dem zuvor vermeintlich stoffwechselgesunden Patienten revidiert und als prädiabetische Stoffwechsellage eingestuft werden. Die auf der Grundlage der HbA1c-Werte beruhende Einstufung der Stoffwechsellage weist in beiden Jahren auf eine prädiabetische Stoffwechsellage hin. Hierdurch bestätigt sich der Verdacht, dass vor dem Einsatz der neuen Entnahmesysteme die Nüchternglukosewerte falsch niedrig gemessen wurden.

Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Studienergebnissen von Szoke et al. und Bruns sowie von Heinemann et al., die zeigen konnten, dass mit der Anwendung von Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen und den konsekutiv höher gemessenen Glukosewerten eine messwertbedingte Zunahme der Prädiabetiker- und Diabetikerprävalenz zu erwarten ist [86, 128, 129].

Aus den eigenen Untersuchungen und den bisher publizierten Studien geht eindeutig hervor, dass die sofortige Hemmung der glykolytischen Aktivität durch Citratzusatz zu einer zuverlässigeren in vitro Stabilität bei der Blutglukosebestimmung führt. Durch die Sicherstellung einer stabilen Glukosekonzentration im Probengefäß entsprechen die Blutzuckerwerte nun weitgehend der zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestehenden in vivo Blutzuckerkonzentration der Patienten. Höher gemessene Glukosekonzentrationen im Vergleich mit Messungen vor Einführung von mit Citrat versetzten sind somit wesentlich auf die Stabilisierung der Blutglukose zurückzuführen. Der Anstieg der Glukosekonzentration im citratgepufferten Probengefäß darf somit nicht als falsch hohe Messung fehlinterpretiert werden, sondern ist auf falsch niedrig gemessene Blutglukosekonzentration im Natriumfluoridröhrchen, infolge der insuffizienten Glykolysehemmung durch Natriumfluorid allein, zurückzuführen. Hierdurch werden Patienten und Patientinnen, welche möglicherweise bereits einen behandlungsbedürftigen Diabetes mellitus haben, fälschlicherweise als stoffwechselgesund oder als noch nicht behandlungswürdig eingeschätzt. Eine rechtszeitige Veränderung des Lebensstils oder auch eine medikamentöse Behandlung des Diabetes bliebe diesen Patienten somit vorenthalten. Durch die in citratgepufferten Entnahmeröhrchen höher gemessenen Glukosewerte werden wesentlich mehr Patienten Glukosekonzentrationen aufweisen, die oberhalb der aktuellen diagnostischen Bewertungsgrenzen liegen, was zu einer veränderten Einstufung der Stoffwechsellage führen kann. Die Folge ist dann auch eine vermeintliche Zunahme der Prädiabetiker- und Diabetikerprävalenz.

Die nach der Umstellung höher gemessenen Wertelagen und die damit verbundene mögliche veränderte Bewertung der Stoffwechsellage geben bei den betroffenen Patienten und den behandelnden Ärzten immer wieder Anlass für Missverständnisse bezüglich der Zusammenhänge und lösen leidenschaftliche Diskussionen aus. Einige der betroffenen Ärzte vertreten die Meinung, dass die höheren Werte messmethodisch bedingt sind. Die Methoden der Glukosebestimmung haben sich allerdings nicht geändert, was durch die dem Labor vorgeschriebenen Kontrollmessungen belegt wird. Auch die nach der Richtlinie der Bundesärztekammer vorgeschriebenen externen Qualitätskontrollen (Ringversuche) belegen die Richtigkeit der

Glukosebestimmungen im Labor. Sicherlich hat die entstandene offene Kritik an der Umsetzung einer längst überfälligen präanalytischen Notwendigkeit auch einen psychologischen Hintergrund: Es fällt schwer einzugestehen, dass über viele Jahre in Abhängigkeit von Dauer der präanalytischen Lagerung bzw. Transportzeit zum Labor falsch niedrige Messergebnisse produziert wurden und diese zu einer Unterschätzung der diabetischen Stoffwechsellage geführt haben. Den betroffenen Patienten nun erklären zu müssen, dass sie nach Umstellung der Entnahmesysteme einen erhöhten Blutzucker haben, stellt ein weiteres Akzeptanzproblem dar.

Die vorgestellten Ergebnisse meiner Arbeit und ihre Bestätigung durch andere Arbeitsgruppen, dass in Röhrchen mit Citrat-Fluorid-Additiv höhere Glukosekonzentrationen gemessen werden, werfen die Frage auf, ob die höher gemessenen Blutzuckerwerte allein den neuen Probengefäßen geschuldet sind oder ob der Glukosestoffwechsels des Patientenkollektivs im Beobachtungszeitraum schlechter eingestellt war. Zur Beantwortung dieser Frage sollte die Auswertung der HbA1c-Werte, als ergänzender Laboranalyt zur Diabetesdiagnose, bei den untersuchten Patienten Aufschluss geben. Anhand der HbA1c-Wertelage sollte auch geprüft werden, ob die veränderten Blutzuckermesswerte nicht sogar zu einer verbesserten Einstellung des Blutzuckers durch Maßnahmen des behandelnden Arztes geführt haben.

Ursprünglich hat man den HbA1c-Wert in Deutschland zur retrospektiven Qualitätskontrolle der Blutzuckereinstellung eingeführt. Aufgrund nachgewiesener Vorteile hat die Deutsche Diabetes Gesellschaft im Jahr 2010 die HbA1c-Messung jedoch auch als diagnostischen Parameter empfohlen [99]. In den aktuellen nationalen Leitlinien wird die Verwendung des HbA1c zum Diabetesausschluss ($\text{HbA1c} < 5,7 \%$) und zur Bestätigung eines Diabetes ($\text{HbA1c} \geq 6,5 \%$) empfohlen. Dabei stützt sich die DDG auf epidemiologische Untersuchungen, die zum einen belegen, dass die Spezifität einer HbA1c-Konzentration von $\geq 6,5 \%$ ausreicht, um mit Sicherheit die Diagnose Diabetes mellitus zu stellen und zum anderen zeigen, dass bei einem $\text{HbA1c} < 5,7 \%$ eine ausreichend hohe diagnostische Sensitivität vorliegt, die einen Diabetes mellitus sicher ausschließt [124]. Die Amerikanische Diabetes Gesellschaft (ADA) nutzt den HbA1c-Wert auch zur Identifizierung eines Prädiabetikers (HbA1c zwischen $5,7 \%$ und $6,4 \%$, $39\text{-}47 \text{ mmol/mol Hb}$) [147]. Die DDG hingegen empfiehlt bei HbA1c-Werten zwischen $5,7$ und $6,4 \%$ eine Messung der Nüchternplasmaglukose einschließlich der Durchführung eines oralen Glukosetoleranztestes. Außerdem sollte die Glukosemessung bevorzugt durchgeführt werden, wenn bereits Diabetes-Symptome vorliegen oder eine Beeinflussung oder Verfälschung des HbA1c-Wertes zu erwarten ist [30, 99].

Uneingeschränkt kann die Bestimmung des HbA1c nämlich nicht erfolgen, es muss berücksichtigt werden, dass die diagnostische Wertigkeit des HbA1c durch die Varianz der Analysemethode und mögliche weitere Einflussfaktoren limitiert ist.

Falsch hohe HbA1c-Werte finden sich bei einer verlängerten Erythrozytenüberlebensdauer, bei Eisenmangelanämie, nach Splenektomie, bei aplastischen Anämie, sowie infolge von Tumor- oder Infektanämie und bei terminaler Niereninsuffizienz (Entstehung von carbamylisiertem Hämoglobin). Hämoglobinopathien vom HbH-, HbF- und HbE-Typ sowie eine hochdosierte Langzeitbehandlung mit Acetylsalicylsäure mit konsekutiver Bildung von acetyliertem Hämoglobin, aber auch genetisch bedingte Hyperglykierung bei entsprechender ethnischer Zugehörigkeit und letztlich auch ein höheres Lebensalter können ebenfalls zu erhöhten HbA1c-Spiegeln führen.

Ursachen falsch niedriger HbA1c-Werte sind eine verkürzte Erythrozytenlebensdauer bei gesteigertem „Erythrozyten-turn-over“ (u. a. bei Hochleistungssportlern), bei hämolytischer Anämie oder größerem Blutverlust sowie bei Erythropoetin- und Eisentherapie, Folsäuremangel, und Schwangerschaft). Hämoglobinvarianten wie HbS, HbC, HbD, führen ebenso wie die chronische Niereninsuffizienz oder eine Leberzirrhose [29, 90] zu erniedrigten HbA1c-Werten. Hinzu kommt, dass die verfügbaren Routinemessmethoden vielfältigen Einflussfaktoren unterliegen, die Fehlbeurteilung der HbA1c-Ergebnisse begünstigen können. Die *International Federation for Clinical Chemistry* (IFCC) veröffentlichte 2002 eine Referenzmethode [148] mit dem Ziel der Rückführbarkeit des benutzten Messverfahrens auf einen internationalen Standard. Das neue Referenzverfahren besteht aus einer Kombination von Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Herstellern wird empfohlen, Geräte mit einem IFCC-Kalibrator zu verwenden und die IFCC-Methode als Referenzmethode zu etablieren. Die Umstellung der standardisierten Messmethode war in Deutschland bis März 2010 abgeschlossen [89]. Allerdings zeigt die HbA1c-Analytik – trotz langjähriger Bemühungen der Standardisierung und Verbesserung der Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Messmethode – weiterhin laboratoriumsabhängige Unterschiede bei der täglichen Messung. Die Messabweichung, die mit dem jeweiligen Analyseverfahren auftreten kann, unterscheidet sich dabei methodenabhängig [130, 131]. Leca et al. haben 2012 Ergebnisse zum Vergleich von Messungen im Labor und von parallelen Point-of-care-Messung veröffentlicht. Dabei stellen sie fest, dass 98 % der HbA1c-Messwerte an POCT Geräten durchschnittlich um 0,5 % (5,5 mmol/mol Hb) niedriger ausfielen als bei der Messung im Zentrallabor [132]. Auch bei wiederholten Messungen mit der gleichen Messmethode (Intra-Assay-Varianz) zeigten sich ähnliche Abweichungen [133].

In Deutschland wird derzeit eine HbA1c- Abweichung von $\pm 18 \%$ in Ringversuchen toleriert, was bedeutet, dass bei einem Sollwert von $6,5 \%$ der HbA1c-Wert bei der externen Qualitätskontrolle $5,8 - 7,2 \%$ betragen kann [134]. Diesbezüglich wird von der Kommission für Labordiagnostik in der Diabetologie (KLD) zur Diagnose- und Therapiesicherheit des HbA1c eine verminderte zulässige Abweichung auf $\pm 8 \%$ gefordert, wie z.B. in den USA ($\pm 6 \%$) oder in der Schweiz ($\pm 10 \%$) [29, 131, 135].

In meinen Untersuchungen zur Beurteilung der HbA1c-Wertelage in den Vergleichsjahren 2014 und 2015 wurden insgesamt 2.243 HbA1c-Bestimmungen, die bei den 201 Patienten des gesondert betrachteten Kollektivs gemessen wurden, ausgewertet. Im Ergebnis der Untersuchungen zeigte sich, dass sich die durchschnittlichen HbA1c-Werte im Jahr 2015 im Vergleich zum Vorjahr nur marginal verändert haben. Der HbA1c-Jahresmittelwert liegt im Jahr 2014 bei $6,3 \%$ und 2015 bei $6,2 \%$. Die HbA1c-Wertelage hat somit im Jahr 2015 um gerade einmal $1,6 \%$ abgenommen. Anhand von Boxplotdarstellungen der HbA1c-Einzelmessungen über 24 Monate (Abbildung 13) lässt sich erkennen, dass sich die Wertelagen über den gesamten Beobachtungszeitraum weitestgehend gleich verhalten.

In Übereinstimmung mit meinen in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen zeigen zwei aktuelle Studien, dass sich die HbA1c-Wertelage nach der Einführung von Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen zur Plasmaglukosemessung nicht signifikant verändert hat. In der einen Studie analysieren Ridefelt et al. insgesamt 55.190 HbA1c-Messwerte mit dem Ergebnis, dass vor Einführung der Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen der durchschnittliche HbA1c $6,21 \%$ und nach Einführung $6,22 \%$ betrug. Damit ist die HbA1c-Konzentration im Beobachtungszeitraum mit einem leichten Anstieg von gerade $0,1 \%$ nahezu konstant geblieben [127]. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen in einer zweiten Studie Pasqualetti et al., die in ihrer Arbeit 14.312 HbA1c-Werte auswerteten [136]. Sie stellen fest, dass die durchschnittliche HbA1c-Wertelage vor Umstellung der Probengefäße $6,63 \%$ und danach $6,27 \%$ betrug. Im Vergleich zu meinen Untersuchungen und den Ergebnissen von Ridefelt et al. ist die Abnahme der HbA1c-Konzentration in dieser Studie nach Einführung der Citratröhrchen mit 5% größer, aber dennoch klinisch nicht signifikant. Diese Abnahme ist wahrscheinlich auf eine Optimierung der Blutzuckereinstellung aufgrund der höher gemessenen Glukosewerte zurückzuführen.

Zusammenfassend kann man nach den Untersuchungen der HbA1c-Wertlage festhalten, dass sich die HbA1c-Werte der Patienten nach Einführung der neuen Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen trotz erhöht gemessener Nüchternglukosekonzentrationen nicht wesentlich verändert haben.

Die Patienten waren also offensichtlich keiner veränderten Stoffwechselsituation im Beobachtungszeitraum ausgesetzt. Zu einer ähnlichen Bewertung kommen auch Pasqualetti und Ridefelt et al. in ihren weiter oben schon erwähnten Studien.

Die vorliegenden Untersuchungen an 201 Studienteilnehmern zeigen, dass sich die gemessenen Glukosewerte, nach der 2015 erfolgten Einführung der Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen gegenüber dem Vorjahr statistisch hoch signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ (paariger t-Test) unterscheiden. Für die patientenbezogenen HbA1c-Werte ist die Wertelageänderung vom Jahr 2014 auf das Jahr 2015 nur marginal, aber mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,023$ dennoch statistisch signifikant (Wilcoxon Signed Rank Test).

Die Beurteilung der diabetischen Stoffwechsellage der untersuchten 201 Patienten des Verlaufsstudienkollektivs ist insofern von Relevanz, weil aufgrund der höher gemessenen Blutzuckerkonzentrationen nach Umstellung der Blutentnahmesysteme für die behandelnden Hausärzte berechtigterweise die Notwendigkeit einer veränderten Bewertung der diabetischen Stoffwechselsituationen (Stoffwechselgesund - Prädiabetes - Manifester Diabetes mellitus) in Betracht gezogen wurde. Da die Einteilung der diabetischen Stoffwechsellage nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft sowohl anhand der Nüchternglukose als auch durch die HbA1c-Konzentration erfolgen kann, konnte den Ärzten mit der Analyse der HbA1c-Werte eine Entscheidungshilfe gegeben werden.

Wie sich der Abbildung 17 entnehmen lässt, kommt es nach Umstellung der Blutentnahmesysteme bei unveränderten Bewertungsgrenzen für die Nüchternglukose zu deutlichen Verschiebungen in der Einstufung der diabetischen Stoffwechsellage. Der Anteil der Patienten mit einem manifesten Diabetes steigt an. Die Zunahme resultiert aus einem Übergang von Patienten mit einer zuvor prädiabetischen Stoffwechsellage zu einem manifesten Diabetes. Der Anteil der Prädiabetiker ist gleichgeblieben, was sich durch eine Verschiebung von Nichtdiabetiker zu Patienten mit einem Prädiabetes hin erklärt. Dementsprechend hat sich der prozentuale Anteil der stoffwechselgesunden Patienten verringert. Betrachtet man den Anteil der Patienten mit einem beginnenden und manifesten Diabetes mellitus zusammen, so mussten im Jahr 2015 19 % mehr Patienten dieser Bewertung zugeordnet werden.

Ridefelt et al. kommen in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis, dass der Anteil der Prädiabetiker und Patienten mit manifestem Diabetes um 18 % zugenommen hat, was weitestgehend meiner Beobachtung entspricht [127].

Dieser Anstieg fällt im Vergleich zu meinen Ergebnissen etwas geringer aus, was daran liegen kann, dass die von den Autoren ausgewerteten Daten nicht selektiert wurden. Ausgewertet wurden alle eingegangenen Blutzuckerwerte, unabhängig von der Einhaltung einer Nahrungskarenz der Patienten. Außerdem wird der genaue Zeitpunkt für die Umstellung der Blutentnahmeröhrchen nicht angegeben. Neben den Proben aus dem hausärztlichen Bereich wurden auch Proben im Rahmen der Notfalldiagnostik des Krankenhauses analysiert, was zu einer schnelleren Analyse im Labor und folglich zu einem geringeren Einfluss der *in vitro* Glykolyse auf die Blutzuckerkonzentration geführt haben könnte.

Bezüglich der Änderung der Stoffwechsellage anhand der HbA1c-Konzentrationen (Abb. 18a-c) lassen sich veränderte Zuordnungen zwischen den einzelnen Stoffwechselklassen sowohl in Richtung einer verschlechterten Stoffwechsellage als auch in Richtung einer gebesserten Blutzuckereinstellung feststellen. Am deutlichsten wird die Veränderung für den Anteil der offensichtlich stoffwechselgesunden Patienten: Im Vergleich zum Vorjahr nimmt der Anteil der stoffwechselmäßig unauffälligen oder gut eingestellten Patienten 2015 um 4 % zu, wohingegen der Anteil der Patienten mit einer prädiabetischen und diabetischen Stoffwechsellage nach den HbA1c Kriterien in entsprechender Größenordnung abnimmt. Es ist durchaus vorstellbar, dass diese Verschiebungen zugunsten einer gebesserten Stoffwechsellage unterschiedliche Ursachen, wie z.B. intraindividuelle Blutzuckerschwankungen, haben können oder - wie im Vorfeld schon argumentiert - ein Hinweis auf eine zusätzliche therapeutische Maßnahme der behandelnden Ärzte, als Reaktion auf die höher gemessenen Blutzuckerkonzentrationen im Jahr 2015, darstellen.

Die nach den für 2014 vorgenommenen Bewertungen der diabetischen Stoffwechsellage, auf Grundlage der geltenden Glukose- und HbA1c-Entscheidungskriterien, zeigen im Vergleich deutliche Unterschiede. Wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist, fällt der Anteil der auf Basis der Blutzuckerwerte diagnostizierten stoffwechselgesunden Patienten um 12 % höher aus als der Anteil an Patienten mit vermeintlich normalem Glukosestoffwechsel, wenn die HbA1c-Entscheidungsgrenzen zugrunde gelegt werden. Die Bewertung der HbA1c-Werte führt andererseits zu 12 % mehr Patienten mit prädiabetischer und diabetischer Stoffwechsellage, verglichen mit ihrer Einstufung mit Hilfe der vor der Umstellung der Entnahmegefäße gemessenen Nüchternglukosewerte. Diese für 2014 offensichtliche Diskrepanz ist meiner Ansicht nach Ausdruck einer insuffizienten Glykolysehemmung durch Natriumfluorid ohne Ansäuerung durch Citrat. Durch die hierdurch bedingt niedriger gemessenen Glukosekonzentrationen erklärt sich eine „Unterschätzung“ der diabetischen Stoffwechsellage.

Die im Jahr 2015 entsprechende Veränderung zeigt, dass durch die Bewertung der Glukosewerte im Vergleich zur HbA1c-Bestimmung 12 % mehr Patienten mit manifestem Diabetes aber 11 % weniger Patienten als Nicht-Diabetiker identifiziert werden (Tabelle 8).

Nach Umstellung der Entnahmeröhrchen ging die Erwartung eigentlich dahin, dass im Jahr 2015 die Anzahl der durch die Nüchternblutzuckerbestimmung oder durch die HbA1c-Bestimmung identifizierten Diabetiker annähernd gleich sein sollte. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen jedoch, dass es auch nach der Einführung von Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen zu unterschiedlichen Bewertungen der Glukosestoffwechsellaage nach den Glukose- und HbA1c-Kriterien kommt.

Um diese offensichtliche Beobachtung zu relativieren, ist es notwendig, auf Limitationen der vorliegenden retrospektiven Feldstudie, auf die sich meine Analysen beziehen, einzugehen. Die Auswertung der Studie basiert auf retrospektiv aus dem Laborinformationssystem erhobenen Daten. Ob die Blutentnahme in jedem Fall nüchtern erfolgte, kann nicht mehr nachvollzogen werden. Das Gleiche gilt auch für den korrekten Füllstand und die Handhabung der Röhrchen. Durch solche bei dieser Studie nicht sicher auszuschließenden Fehler lässt sich möglicherweise erklären, dass die Bestimmung der Nüchternglukose bei einigen Patienten zu Abweichungen in der Bewertung der Stoffwechsellaage führt.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die durch die Bewertung der Glukosewerte um 12 % höhere Diabetesrate im Vergleich zur HbA1c-Bestimmung, welche in den beiden Untersuchungsjahren vergleichbar ausfällt, ist meiner Ansicht nach auch eine Überschätzung der Nüchternplasmaglukosewerte durch die aktuell festgelegten Bewertungsgrenzen für die Diagnose einer diabetischen Stoffwechsellaage.

Inwiefern eine geeignete präanalytische, also effektive Glykolysehemmung in den früheren Studien zur Grenzwertbestimmung berücksichtigt wurde, ist unzureichend dokumentiert. In der Regel wurden in den Studien Natriumfluoridröhrchen zur Festlegung der Diagnosekriterien verwendet. Oft fehlen Angaben zur Dauer zwischen der Blutentnahme und der Plasmaseparation oder es kann nicht nachvollzogen werden, welches Entnahmeröhrchen benutzt wurde [105, 127, 137]. Werden nun in der täglichen Praxis andere Röhrchen verwendet, als in den Studien zur Grenzwertfestlegung, dann könnte es aufgrund der nun höher gemessenen Glukosekonzentration zu Fehleinschätzungen der Stoffwechsellaage kommen [138].

Einheitliche Referenzwerte und Interventionsgrenzen dienen der korrekten Klassifizierung und einem optimalen Management der Behandlung eines Diabetes mellitus.

Ein zuverlässiges Umsetzen der Leitlinien und eine Gewährleistung der Patientensicherheit ist aber nur dann gegeben, wenn durch realistische und nachprüfbare Interventionswerte eine Früherkennung des Diabetes mellitus sichergestellt ist [137, 139].

Unter Berücksichtigung der neuen Empfehlungen zur Verwendung der Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen sind die derzeit in den Leitlinien empfohlenen Entscheidungsgrenzen nach Meinung einiger Autoren zu niedrig definiert [45, 129, 137], wobei damit argumentiert wird, dass bei Verwendung der angesäuerten Entnahmesysteme die Prävalenz von Patienten mit einem Prädiabetes oder einem manifesten Diabetes mellitus zunimmt [86].

Ob die aktuell gültigen Referenz- bzw. Interventionswerte bei Verwendung der neuen Blutentnahmeröhrchen angepasst werden müssen oder ob die Grenzwerte weiterverwendet werden sollen, wird aktuell kontrovers diskutiert. Allerdings wird dabei vergessen, dass die Umstellung der Entnahmesysteme u.a. in den skandinavischen Ländern bereits vor Jahren erfolgte (Finnland im Jahr 2000, Schweden und Dänemark 2006 und 2010 in den USA) und nicht zu einer Überprüfung oder Neufassung der Referenz- oder Interventionsgrenzen verbunden wurden. Mehrere Autoren fordern aber eine Neufestlegung der aktuellen Grenzwerte auf Grundlage von epidemiologischen Studien unter den optimalen präanalytischen Entnahmebedingungen zur Sicherstellung einer einheitlichen Patientenversorgung [32, 105, 138–140]. Auch in den aktuellen Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft vom Oktober 2019 wird eine Überprüfung der Referenzbereiche gefordert [104]. Ob die Festlegung neuer Grenzwerte sinnvoll ist, bedarf zukünftig weiterer empirischer evidenzbasierter Untersuchungen. Der Prozess einer Grenzwertfindung ist anspruchsvoll und muss klinische, epidemiologische und ökonomische Aspekte berücksichtigen [141]. Die Anwendung eines allgemeinen Korrekturfaktors, zur Anpassung der aktuellen Grenzwerte, ist allerdings, als Alternative zur Reevaluierung der Referenzwerte, nicht sinnvoll. Grund hierfür ist, dass eine individuell unterschiedliche Glykolyserate in den bisher nicht einheitlich konfigurierten und eingesetzten Entnahmesystemen, sowie die logistisch bedingten unterschiedlichen Zeiten bis zur Analyse zu individuellen Schwankungen der Glukosewerte führen [128, 137, 139].

Unter diesen Gesichtspunkten muss auch die Beibehaltung der Grenzwerte diskutiert werden, da vor der Umstellung Patienten mit einem erhöhten Diabetesrisiko oder gar einem manifesten Diabetes mellitus nun früher erkannt werden [127], damit diabetesassoziierte Komplikationen rechtzeitig präventiv behandelt werden können.

Ein Beispiel für die Neudefinierung von Grenzwerten liefert die im Juni 2008 publizierte *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome* (HAPO)- Studie. Hierbei handelt es sich um eine weltweite Studie, in die 25.000 Schwangere eingeschlossen wurden, mit dem Ziel, international einheitliche Grenzwerte für den 75g-oralen Glukosetoleranztest (oGTT) in der Schwangerschaft festzulegen [142]. Die auf hohem Evidenzniveau basierende Festlegung der Grenz- bzw. Interventionswerte orientiert sich maßgeblich an den kindlichen prä- und postnatalen Komplikationen, wie fetaler Makrosomie, Hyperinsulinismus und therapiebedürftiger Hypoglykämie des Neugeborenen. Im Ergebnis dieser Studie zeigt sich, dass bezogen auf den oralen Glukosetoleranztest bereits geringe Erhöhungen der mütterlichen Plasmaglukosewerte in der 28. Schwangerschaftswoche das Risiko für ungünstige maternale, fetale und neonatale Ereignisse signifikant erhöhen [143, 144]. Diese im Rahmen der Studie ermittelten Werte führten zur Festlegung neuer Blutglukose-Grenzwerte für den 75g-oGTT. Die Grenze für die Nüchternplasmaglukose lag vorher bei 95 mg/dl (5,3 mmol/l) und für den 2-Stunden Wert bei 155 mg/dl (8,6 mmol/l). Weiterhin musste die Entscheidungsgrenze mindestens zu zwei Zeitpunkten überschritten werden, um die Diagnose eines Gestationsdiabetes mellitus stellen zu können [145]. In Deutschland ist im August 2011 die Leitlinie zum Gestationsdiabetes aktualisiert worden [82]. Seitdem gilt die Diagnose eines Gestationsdiabetes mellitus als gesichert, wenn mindestens einer der drei Glukosewerte im venösen Plasma die Entscheidungsgrenze überschreitet. Die diagnostischen Grenzwerte der Glukose im venösen Plasma betragen jetzt nüchtern vor Glukosegabe 92 mg/dl (5,1 mmol/l), 1 Stunde nach 75g-Glukosegabe 180mg/dl (10 mmol/l) und 2 Stunden nach Glukosegabe 153 mg/dl (8,5 mmol/l) [54, 146]. In der HAPO-Studie waren die präanalytischen Bedingungen der Glukosebestimmung nach dem Goldstandardverfahren zur Blutzuckerbestimmung festgelegt worden: Die Vollblutprobe wurde sofort auf Eis gelagert und innerhalb von 30 Minuten nach Venenpunktion in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Das anschließend abpipettierte venöse Plasma wurde gekühlt innerhalb von 24 Stunden ins Zentrallabor nach Belfast zur zentralen Glukosemessung versandt. Durch dieses Verfahren wird die in vitro Glykolyse im nun zellfreien Plasma effektiv vermieden. Die Entscheidungsgrenzen für die Gestationsdiabetes-Diagnostik wurden aus den Messergebnissen der Studie statistisch ermittelt [142]. Die in den aktuellen Leitlinien festgelegten Glukosereferenzbereiche können allerdings nur dann für die klinische Entscheidung herangezogen werden, wenn für die Glukosemessung Blutentnahmesysteme verwendet werden, die die in vitro Glykolyse vergleichbar mit der Goldstandardmethode unterbinden. Da dieses wie weiter oben ausgeführt, nur in Natriumfluorid/Citrat-Blutentnahmeröhrchen gewährleistet wird, werden diese

für Glukosebelastungstests bei Schwangeren zwingend vorgeschrieben. Letztlich sollte dieses grundsätzlich im Sinne einer Standardisierung der Blutglukosemessung gelten.

Aktuelle Empfehlungen in der Praxis

Aufgrund des aktuellen Kenntnisstandes und den Empfehlungen der Fachgesellschaften sollten die Laboratorien nur noch Glukosebestimmungen aus citratgepufferten Entnahmesystemen durchführen. Die Ärzteschaft und auch deren Mitarbeiter sowie die Patienten müssen in die geplante Umstellung rechtzeitig mit einbezogen werden und sachgerecht über die präanalytische Problematik der in vitro Glykolyse und das Wirkprinzip der zusätzlichen Ansäuerung der weiterhin mit Natriumfluorid versetzten Entnahmesysteme informiert werden. Hierzu gehört auch der Hinweis auf die mögliche Veränderung der Blutzuckerwerte und ihre Interpretation im Sinne einer argumentativen Hilfestellung und notwendige Patienteninformation. Hierbei kann auch der Verweis auf die Bewertung der diabetischen Stoffwechsellage durch die parallele Bestimmung des HbA1c-Wertes hilfreich sein, obwohl dieser Wert durch Begleiterkrankungen- oder Begleitumstände (z.B. Anämie, Niereninsuffizienz, Schwangerschaft oder Hämoglobinopathien) verfälscht sein kann. Ist das nicht der Fall, so kann bei einem HbA1c von $> 6,5\%$ aufgrund der hohen Spezifität dieser Entscheidungsgrenze die Diagnose eines Diabetes gestellt werden. Bei Werten $< 6,5\%$ kann ein Diabetes jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, sodass für den Bereich von $5,7 - 6,4\%$ die zusätzliche Durchführung eines oGTT empfohlen wird. An dieser Stelle ist noch ergänzend anzumerken, dass der Effekt der Umstellung der Entnahmesysteme unterschiedlich ausfällt. Die hier untersuchten Patientenmesswerte stammen aus Einsendepraxen in der näheren aber auch deutlich weiter entfernten Umgebung des Labors. Es ist anzunehmen, dass diejenigen Praxen, in denen die durch die Umstellung veränderten Blutglukosewerte besonders aufgefallen sind, diejenigen sind, die vom Einsendelabor besonders weit entfernt liegen und bei denen aufgrund längerer Transportwege die Analyse im Labor erst nach 3- 4 Stunden erfolgte. Proben, die das Labor schneller erreichen zeigen - nach Einführung der neuen Systeme - keinen so deutlichen Unterschied in der Glukosekonzentration. In Krankenhäusern und Notaufnahmen, wo eine Bestimmung der Blutglukose durch das interne Labor innerhalb der ersten 15-30 Minuten erfolgt, hat die in vitro Glykolyse einen nur sehr geringen Einfluss auf die Glukosewerte, sodass die Umstellung zu weit weniger auffälligen Veränderungen geführt hat. Allerdings dürften bei stationär aufgenommenen Patienten Diskrepanzen der Blutzuckerwertelagen gegenüber den aus der Praxis mitgebrachten Werten aufgefallen sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Blutglukosebestimmung gehört zu den häufigsten Laboranforderungen im klinischen Alltag. Für die korrekte und reproduzierbare Messung der Nüchternglukose im Vollblut müssen präanalytische Fehlerquellen erkannt und vermieden werden. Neben der Einhaltung einer ausreichend langen Nahrungskarenz ist die Hemmung der durch die zellulären Bestandteile des Blutes bedingten, zeitkritischen in vitro Glykolyse durch glukoseabbauende Enzyme erforderlich. Auch nach der Blutentnahme setzt sich in den korpuskulären Bestandteilen des Vollblutes, insbesondere in den Erythrozyten die Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse fort, wodurch es zu einem Glukosekonzentrationsverlust in der Probe und damit zu falsch niedrigen Labormesswerten kommt. Die Geschwindigkeit des anaeroben Glukoseabbaus in einer Blutprobe variiert bei Lagerung unter Raumtemperatur und geht mit einem Glukosekonzentrationsabfall von etwa 5 - 7 % pro Stunde (ca. 0,6 mmol/l/h) einher. Dieser ist nur durch eine effektive Glykolysehemmung zu vermeiden. Nach der Goldstandardmethode muss für die Blutglukosemessung die Vollblutprobe 15 Minuten nach der Blutentnahme in einer Zentrifuge gekühlt zentrifugiert und der Plasmaüberstand von den zellulären Bestandteilen getrennt werden. Die Messung des Blutzuckers erfolgt anschließend innerhalb von 24 Stunden aus dem venösen Plasma. Da das Goldstandardverfahren vor allem in den niedergelassenen Praxen nicht praktikabel ist, wurde seit Jahren eine suboptimale in vitro Glykolysehemmung mit Natriumfluoridzusatz zum Entnahmeröhrchen angewandt.

Entsprechend der Empfehlung der Deutschen Diabetes Gesellschaft aus dem Jahr 2011 wurde für die Einsender des Medizinischen Versorgungszentrums der Medizinisch Diagnostischen Institute Berlin am 01.01.2015 ein alternatives Glukoseabnahmesystem, das neben Natriumfluorid auch Citratpuffer als Granulat oder als flüssigen Zusatz enthält, eingeführt. Diese Entscheidung wurde u.a. mit den unterschiedlich weiten Proben transportwegen begründet. Der Citrateffekt hemmt die Glykolyse innerhalb weniger Minuten, während Natriumfluorid erst nach circa 4 Stunden wirksam wird. Durch die Kombination der beiden Wirkprinzipien wird der präanalytische Abfall der Glucosekonzentration auf 1-2 % in 24 Stunden minimiert.

In meiner hier vorgelegten Dissertationsschrift werden 193.899 Nüchternplasmaglukosewerte, die in den Jahren 2014 und 2015 in den eingesandten Proben von 53.046 Patienten gemessen wurden, miteinander verglichen, wobei 2014 nur mit Natriumfluorid stabilisierte Entnahmesysteme (Primavette® S Glucose von Kabe Labortechnik, Vacutainer® von Becton-Dickinson) und 2015 ausschließlich die neuen, durch Ansäuerung und Natriumfluorid stabilisierten

Blutentnahmeröhrchen (Vacuette®GLUCOMEDICS von Greiner Bio-One und Primavette® S Citrat/NaF von Kabe Labortechnik), flächendeckend zur Anwendung kamen.

Ziel dieser retrospektiven Feldstudie war es herauszufinden, wie sich die Wertelage der Nüchternglukose bei einem definierten Patientenkollektiv nach Einführung der citrathaltigen Entnahmeröhrchen verändert hat. Außerdem sollte anhand der HbA1c-Wertelage untersucht werden, ob die verändert gemessene Blutzuckersituation zu einer verbesserten Einstellung des Blutzuckers durch die Hausärzte geführt hat. An einem gesondert betrachteten Patientenkollektiv soll der Vergleich zwischen der HbA1c- und Glukosewertelage Aufschluss über die Veränderung der diabetischen Stoffwechsellage nach den Glukose- und HbA1c-basierten Kriterien geben. Abschließend soll diskutiert werden, inwieweit eine Überprüfung und Neudefinition der aktuell gültigen Grenzwerte für die Nüchternplasmaglukose aufgrund der verminderten in vitro Glykolyse sinnvoll oder sogar notwendig ist.

Die hier vorgelegten Ergebnisse meiner Untersuchungen zeigen, dass am gesamten Patientenkollektiv höhere Glukosewerte in den citrathaltigen Entnahmeröhrchen gemessen werden. Der Anstieg der gemessenen Glukosekonzentration als Zeichen einer effektiveren Glykolysehemmung beträgt im Mittel 14 %.

Untersuchungen an 201 Patienten ergeben, dass sich trotz höherer gemessener Glukosewerte nur marginale Veränderung der HbA1c-Werte zeigen. Das Patientenkollektiv unterliegt also keiner verschlechterten Stoffwechsellage nach den HbA1c-Bewertungskriterien. Eine Verbesserung der HbA1c-Werte im Jahr 2015 kann als Reaktion der behandelnden Ärzte auf die höher gemessenen Blutzuckerwerte interpretiert werden. Weitere Untersuchungen zeigen, dass im Jahr 2015 die Prävalenz der manifesten Diabetiker nach den Blutzuckerkriterien zunimmt. Insgesamt werden bezogen auf das gesonderte Patientenkollektiv 19 % mehr Diabetesdiagnosen nach Einführung der neuen Entnahmesysteme gestellt. Auf Grundlage der HbA1c-Diagnosekriterien zeigt sich hingegen im Jahr 2015 keine Zunahme der Diabetesprävalenz. Im Jahr 2014 ist der Anteil der per HbA1c-Kriterien diagnostizierten Diabetiker 10 % höher als der Anteil der nach Blutzuckerkriterien diagnostizierten Diabetiker. Diese Diskrepanz ist Ausdruck der insuffizienten Glykolysehemmung in Natriumfluoridröhrchen ohne Citratzusatz. Die Blutzuckermesswerte in den Natriumfluoridröhrchen liegen offensichtlich unterhalb der tatsächlichen in vivo Glukosekonzentrationen, was zur Unterschätzung der diabetischen Stoffwechsellage führt. Im Jahr 2015 zeigt sich allerdings, dass in den citrathaltigen Natriumfluoridröhrchen nach den glukosebasierten Kriterien 12 % mehr Diabetesdiagnosen gestellt werden als nach den HbA1c-

Kriterien. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass in einer solchen retrospektiven Feldstudie die mittleren Glukosewerte präanalytisch nicht nur vom Ausmaß der in vitro Glykolyse anhängig sind, sondern auch von der Compliance des Patienten. Hinzu kommt, dass es mit der Optimierung der präanalytischen Glykolysehemmung in Einzelfällen aufgrund der glukosebasierten Bewertungsgrenzen auch zu einer Überschätzung der diabetischen Stoffwechsellage kommen kann. Inwieweit die Glukosegrenzwerte bzw. die Interventionsgrenzen aufgrund der optimierten Präanalytik neu evaluiert bzw. definiert werden müssen, ist Gegenstand der aktuellen Diskussionen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Laios K, Karamanou M, Saridaki Z, et al. Aretaeus of Cappadocia and the first description of diabetes. *Hormones (Athens)* 2012; 11 (1): 109–113
- [2] Schadowaldt H. Die Geschichte des Diabetes mellitus. In: *Diabetes mellitus*. A. Springer; 1975: 1–44
- [3] Berg A. Die Entwicklung der Lehre vom Diabetes bis zur Gewinnung des Insulins. Lehmann; 1962
- [4] Furdell EL. Fatal thirst: diabetes in Britain until insulin. Brill; pp. 81-92; 2008
- [5] Dominiczak MH. Linking research and innovative clinical practice: the story of diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003; 41 (9): 1104–1106. doi:10.1515/CCLM.2003.172
- [6] Wolff G. Paul Langerhans—Inseln waren sein Schicksal. In: *Diabetes in Medizin-und Kulturgeschichte*. Springer; 1989: 370–385
- [7] Schumacher J. Einst und jetzt: 100 Jahre Diabetes mellitus. In: *Diabetes in Medizin-und Kulturgeschichte*. Springer; 1989: 263–294
- [8] Mering J v., Minkowski O. Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1890; 26 (5): 371–387
- [9] Karamanou M, Protogerou A, Tsoucalas G, et al. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World J Diabetes* 2016; 7 (1): 1–7. doi:10.4239/wjd.v7.i1.1
- [10] WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus & World Health Organization. (1965). *Diabetes mellitus: report of a WHO Expert Committee [meeting held in Geneva from 24 to 30 November 1964]*. World Health Organization. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38442>.
- [11] American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20 (7): 1183–1197. doi:10.2337/diacare.20.7.1183
- [12] Alberti, Kurt George Matthew Mayer, Zimmet Pf. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine* 1998; 15 (7): 539–553
- [13] Müller-Wieland D, Petermann A, Nauck M, et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2016; 11 (S 02): S78-S81. doi:10.1055/s-0042-115159
- [14] Roden M. Diabetes mellitus: definition, classification and diagnosis. *Wiener Klinische Wochenschrift* 2016; 128: 37–40. doi:10.1007/s00508-015-0931-3

- [15] Schlosser M, Mueller PW, Törn C, et al. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies. *Diabetologia* 2010; 53 (12): 2611–2620. doi:10.1007/s00125-010-1915-5
- [16] Törn C, Mueller PW, Schlosser M, et al. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* 2008; 51 (5): 846–852. doi:10.1007/s00125-008-0967-2
- [17] Huang W, Connor E, Rosa TD, et al. Although DR3-DQB1* 0201 may be associated with multiple component diseases of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB1* 0302 haplotype is implicated only in beta-cell autoimmunity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996; 81 (7): 2559–2563
- [18] Cantor AB, Krischer JP, Cuthbertson DD, et al. Age and family relationship accentuate the risk of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in relatives of patients with IDDM. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1995; 80 (12): 3739–3743
- [19] Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J-i, et al. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. *New England Journal of Medicine* 2000; 342 (5): 301–307
- [20] Tamayo T, Brinks R, Hoyer A, et al. The Prevalence and Incidence of Diabetes in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113 (11): 177–182. doi:10.3238/arztebl.2016.0177
- [21] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 7th Edition 2015. URL: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/13-diabetes-atlas-seventh-edition.html>
- [22] Robert Koch-Institut. Prävalenz von Diabetes mellitus. RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut). doi:10.17886/RKI-GBE-2016-003
- [23] Heidemann C, Scheidt-Nave C. Prävalenz, Inzidenz und Mortalität von Diabetes mellitus bei Erwachsenen in Deutschland – Bestandsaufnahme zur Diabetes-Surveillance; 2 (3). Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung; 2017. doi:10.17886/RKI-GBE-2017-050
- [24] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380 (9859): 2095–2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0
- [25] Lichtenauer UD, Seissler J, Scherbaum WA. Die diabetischen Folgeerkrankungen. *Internist (Berl)* 2003; 44 (7): 840–852. doi:10.1007/s00108-003-0996-3
- [26] Resl M, Clodi M. Diabetes und kardiovaskuläre Komplikationen. *Epidemiologie zur Morbidität und Mortalität. Wien Med Wochenschr* 2010; 160 (1-2): 3–7. doi:10.1007/s10354-010-0744-y
- [27] Geiss LS, Herman WH, Smith PJ. Mortality in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes in America* 1995; 2: 233–255
- [28] Am Shaheen F, Al-Khader AA. Epidemiology and causes of end stage renal disease (ESRD). *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 2005; 16 (3): 277

- [29] Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, et al. Fallstricke bei der Diabetesdiagnostik: Wird zu lax mit Laborwerten umgegangen? Dtsch Med Wochenschr 2018; 143 (21): 1549–1555. doi:10.1055/a-0673-2156
- [30] Nauck M, Petersmann A, Müller-Wieland D, et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Diabetologie und Stoffwechsel 2018; 13 (S 02): S90-S96. doi:10.1055/a-0598-0527
- [31] Stiefelhagen P. Welche Therapie für welchen Diabetiker? MMW-Fortschritte der Medizin 2010; 152 (3): 12–16
- [32] Nikolac N. The impact of preanalytical factors on glucose concentration measurement. Biochemia Medica 2014; 24 (3): S41-S44
- [33] Seelig HP. Präanalytik. Karlsruhe: Labor Prof. Seelig und Kollegen; 2008
- [34] Home F. Clinical experiments, histories and dissections. J. Murray and W. Creech; 1783
- [35] Martin M, Fangerau H. Technisierung der Sinne–von der Harnschau zur Urinanalyse. Der Urologe 2009; 48 (5): 535–541
- [36] Kruse-Jarres JD. Blutglucose: Pathobiochemie-Biokinetik-klinisch-chemische Diagnostik; 26 Tabellen. Thieme; 1979
- [37] Trommer CA. Unterscheidung von Gummin, Dextrin, Traubensucker und Rohrzucker. Annalen der Chemie und Pharmacie 1841; 39: 360–362
- [38] Frank H, Kirberger E. * EINE KOLORIMETRISCHE METHODE ZUR BESTIMMUNG DER WAHREN GLUCOSE UND GALACTOSE IN 0, 05CM³ BLUT. BIOCHEMISCHE ZEITSCHRIFT 1950; 320 (4): 359–367
- [39] Hultman E. Rapid specific method for determination of aldosesaccharides in body fluids. Nature 1959; 183 (4654): 108
- [40] Dubowski KM. An o-toluidine method for body-fluid glucose determination. Clinical chemistry 1962; 8 (3): 215–235
- [41] Dörner K, Deufel T. Klinische Chemie und Hämatologie. 73 Tabellen ; [Taschenlehrbuch]. 8. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2013
- [42] Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013, zuletzt geändert: November 2014. Available from: www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de; [cited: 01.12.2019]; DOI: 10.6101/AZQ/000201 Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes. Langfassung. 1. Auflage, Version 4
- [43] Schatz H. Diabetologie kompakt. Grundlagen und Praxis ; mit 82 Tabellen. 5. Aufl. Berlin: Springer; 2014

- [44] Truschnig-Wilders M, Boehm BO, März W. Laboratoriumsdiagnostik bei Diabetes mellitus/Laboratory diagnostics in patients with diabetes mellitus. *Laboratoriumsmedizin* 2004; 28 (4): 334–345
- [45] Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA, et al. Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clinical chemistry* 2009; 55 (5): 1019–1021. doi:10.1373/clinchem.2008.121707
- [46] Carstensen B, Lindström J, Sundvall J, et al. Measurement of blood glucose: comparison between different types of specimens. *Ann Clin Biochem* 2008; 45 (Pt 2): 140–148. doi:10.1258/acb.2007.006212
- [47] Miles RR, Roberts RF, Putnam AR, et al. Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes. *Clinical chemistry* 2004; 50 (9): 1704–1706
- [48] Boyanton BL, Blick KE. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clinical chemistry* 2002; 48 (12): 2242–2247
- [49] Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clinical chemistry* 2011; 57 (6): e1-e47. doi:10.1373/clinchem.2010.161596
- [50] Kim HS. Blood Glucose Measurement: Is Serum Equal to Plasma? *Diabetes Metab J* 2016; 40 (5): 365–366. doi:10.4093/dmj.2016.40.5.365
- [51] D'Orazio P, Burnett RW, Fogh-Andersen N, et al. Approved IFCC recommendation on reporting results for blood glucose (abbreviated). *Clinical chemistry* 2005; 51 (9): 1573–1576. doi:10.1373/clinchem.2005.051979
- [52] Lackner K, Luppä PB, Koschinsky T, et al. Ein einheitlicher Kalibrationsbezug (Plasma statt Vollblut)) bei der patientennahen Glukosebestimmung verbessert die Therapiesicherheit beim Einsatz von Glukosekonzentrationswert-abhängigen Therapiealgorithmen. Internet: http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/news/POCT-Glukose_Plasmastandard_DGKL_diabetesDE_1209.pdf 2009
- [53] Neumaier, Michael, et al. "Aktualisierte Anforderungen an die Messqualität und Qualitätssicherung (QS) von Point-of-Care-Testing (POCT)-Blutglukose-Messsystemen mit Unit-use Reagenzien, die für die Erstdiagnostik eines manifesten Diabetes in der Schwangerschaft oder eines Gestationsdiabetes mellitus (GDM) gemäß der GDM-Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) geeignet sind." *LaboratoriumsMedizin* 39.4 (2015): 183-186. DOI: <https://doi.org/10.1515/labmed-2015-0073>
- [54] Deutsche Diabetes Gesellschaft, Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 2. Auflage 2018. URL: https://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/2018/057-0081_S3_Gestationsdiabetes-mellitus-GDM-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2018-03.pdf
- [55] Hammerling JA. A Review of Medical Errors in Laboratory Diagnostics and Where We Are Today. Table 1. *Lab Med* 2012; 43 (2): 41–44. doi:10.1309/LM6ER9WJR1IHQAUY

- [56] Savoca R. Der Laborfehler - warum das Labor nicht (immer) schuld ist. *Ther Umsch* 2015; 72 (2): 113–118. doi:10.1024/0040-5930/a000652
- [57] Simundic A-M, Lippi G. Preanalytical phase – a continuous challenge for laboratory professionals. *Biochem Med* 2012; 145–149. doi:10.11613/BM.2012.017
- [58] Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, et al. Errors in laboratory medicine. *Clinical chemistry* 2002; 48 (5): 691–698
- [59] Dimeski G, Yow KS, Brown NN. What is the most suitable blood collection tube for glucose estimation? *Ann Clin Biochem* 2015; 52 (Pt 2): 270–275. doi:10.1177/0004563214544708
- [60] Cori CF. Embden and the glycolytic pathway. *Trends in Biochemical Sciences* 1983; 8 (7): 257–259
- [61] Lenzen S. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *J Biol Chem* 2014; 289 (18): 12189–12194. doi:10.1074/jbc.R114.557314
- [62] Kresge N, Simoni RD, Hill RL. Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280 (4): e3-e3
- [63] Sokolov SS, Balakireva AV, Markova OV, et al. Negative Feedback of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation: Mechanisms of and Reasons for It. *Biochemistry Mosc* 2015; 80 (5): 559–564. doi:10.1134/S0006297915050065
- [64] TeSlaa T, Teitell MA. Techniques to monitor glycolysis. *Meth Enzymol* 2014; 542: 91–114. doi:10.1016/B978-0-12-416618-9.00005-4
- [65] Yu L, Chen X, Wang L, et al. The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget* 2016; 7 (25): 38908
- [66] Akram M. Mini-review on glycolysis and cancer. *J Cancer Educ* 2013; 28 (3): 454–457. doi:10.1007/s13187-013-0486-9
- [67] D'Alessandro A, Nemkov T, Sun K, et al. AltitudeOmics: Red Blood Cell Metabolic Adaptation to High Altitude Hypoxia. *J Proteome Res* 2016; 15 (10): 3883–3895. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00733
- [68] van Wijk R, van Solinge WW. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 2005; 106 (13): 4034–4042. doi:10.1182/blood-2005-04-1622
- [69] Kordonouri O, Danne T, Lange K. Diabetische Ketoazidose (DKA) und hyperglykämisches hyperosmolares Syndrom. In: *Kompodium pädiatrische Diabetologie*. Springer; 2016: 309–331
- [70] Baynes JW, Dominiczak MH. *Medical Biochemistry*. Elsevier Health Sciences; 2018
- [71] Narayanan S. The preanalytic phase: an important component of laboratory medicine. *American journal of clinical pathology* 2000; 113 (3): 429–452
- [72] Stahl M, Jorgensen LGM, Petersen PH, et al. Optimization of preanalytical conditions and analysis of plasma glucose. 1. Impact of the new WHO and ADA recommendations on

- p>diagnosis of diabetes mellitus. SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL & LABORATORY INVESTIGATION 2001; 61 (3): 169–179
- [73] Peake MJ, Bruns DE, Sacks DB, et al. It's time for a better blood collection tube to improve the reliability of glucose results. Diabetes Care 2013; 36 (1). doi:10.2337/dc12-1312
 - [74] Yagmur E, Van Helden J, Koch A, et al. Effective inhibition of glycolysis in venous whole blood and plasma samples. Laboratoriumsmedizin 2012; 36 (3): 169–177. doi:10.1515/labmed-2012-0020
 - [75] Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. Diagnostic samples: from the patient to the laboratory: the impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. John Wiley & Sons; 2014
 - [76] Sabri MI, Ochs S. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in mammalian nerve by iodoacetic acid. Journal of neurochemistry 1971; 18 (8): 1509–1514
 - [77] Schmidt M, Dringen R. Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. Frontiers in neuroenergetics 2009; 1: 1
 - [78] Foucher B, Pina G, Desjeux G, Cheminel V, Prevosto JM, Hrsg. Stabilité de la glycémie avant centrifugation avec ou sans antiglycolytique. Bd. 62; 2004
 - [79] Chan AY, Ho CS, Chan TY, et al. D-mannose as a preservative of glucose in blood samples. Clinical chemistry 1992; 38 (3): 411–413
 - [80] Ho CS, Fung SL, Chan AY. Interference of D-mannose in glucose measurements by glucose oxidase and hexokinase methods. Clinical chemistry 1991; 37 (3): 477
 - [81] Deutsche Akkreditierungsstelle. Beschlüsse des Sektorkomitees Medizinische Laboratorien zu Anforderungen der DIN EN ISO 15189:2014 an die Qualität und Kompetenz von Medizinischen Laboratorien 2017. URL: https://www.dakks.de/sites/default/files/dokumente/71_sd_3_025_beschluesse_sk_medlab_20171117_v1.4.pdf
 - [82] Kleinwechter H, Schäfer-Graf U, et al. Gestationsdiabetes mellitus (GDM) 2011. *Diabetologie und Stoffwechsel*, 6(05), 290-328. DOI: 10.1055/s-0031-1283757
 - [83] Kleinwechter H, Heinemann L, Freckmann G. Diagnostik des Gestationsdiabetes: Die Crux liegt bei der Blutentnahme. *Perspektiven der Diabetologie* 2015; 1: 24–27
 - [84] Lin YL, Smith CH, Dietzler DN. Stabilization of blood glucose by cooling with ice: an effective procedure for preservation of samples from adults and newborns. Clinical chemistry 1976; 22 (12): 2031–2033
 - [85] Uchida K, Matuse R, Toyoda E, et al. A new method of inhibiting glycolysis in blood samples. Clin Chim Acta 1988; 172 (1): 101–108
 - [86] Heinemann L, Koschinsky T, Kleinwechter H, et al. Do more "artificial" Diagnoses of Gestational Diabetes come through the Use of nitrate containing Blood Collection Tubes? Diabetes, Stoffwechsel und Herz 2015; 24
 - [87] Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin Chim Acta 1968; 22 (2): 296–298

- [88] Rahbar S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1043: 9–19. doi:10.1196/annals.1333.002
- [89] Landgraf R, Kowall B, Rathmann W. HbA1c – ein Alleskönner? *Diabetologe* 2011; 7 (5): 335–346. doi:10.1007/s11428-011-0739-3
- [90] Gallagher EJ, Le Roith D, Bloomgarden Z. Review of hemoglobin A(1c) in the management of diabetes. *J Diabetes* 2009; 1 (1): 9–17. doi:10.1111/j.1753-0407.2009.00009.x
- [91] Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, et al. Interlaboratory comparison of glycohemoglobin results: College of American Pathologists Survey data. *Clinical chemistry* 1991; 37 (10): 1725–1729
- [92] Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FAJ, et al. Glycohaemoglobin: comparison of 12 analytical methods, applied to lyophilized haemolysates by 101 laboratories in an external quality assurance programme. *Ann Clin Biochem* 1993; 30 (2): 169–174
- [93] Hoshine T, Okahashi M, Arai H. Survey and assessment of the actual state of routine measurement of glycohaemoglobin/GHb by commercial methods: warning to the users and the providers. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 1997; 15 (9-10): 1551–1562
- [94] Mosca A, Paleari R, Trapolino A, Capani F, Pagano G, Plebani M, Hrsg. A re-evaluation of glycohaemoglobin standardisation: the Italian experience with 119 laboratories and 12 methods. Bd. 35; 1997
- [95] Danne T, Mueller-Wieland D, Lackner K, Schleicher E. Bekanntmachungen: HbA1c bisher blische Einheiten knnen neben den neuen weiterverwendet werden. *Dtsch Arztebl International* 2009; 106 (33): A-1633
- [96] Reinauer H, Scherbaum WA. Diabetes mellitus: Neuer Referenzstandard fr HbA1c. *Dtsch Arztebl International* 2009; 106 (17): A-805
- [97] Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson J-O, et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clinical chemistry* 2004; 50 (1): 166–174. doi:10.1373/clinchem.2003.024802
- [98] Selvin E, Crainiceanu CM, Brancati FL, et al. Short-term variability in measures of glycemia and implications for the classification of diabetes. *Archives of internal medicine* 2007; 167 (14): 1545–1551
- [99] Brückel J, Joost HG, Kerner W, et al. Stellungnahme der Deutschen Diabetes Gesellschaft, diabetesDE und des Kompetenznetzes Diabetes mellitus zur Verwendung des HbA1c-Wertes als Biomarker zur Diabetesdiagnose. URL: http://profi.diabetesde.org/stellungnahmen/hba1c_wertes_als_biomarker/(22.12. 2011) 2010
- [100] Duller C. Einführung in die nichtparametrische Statistik mit SAS und R: Ein anwendungsorientiertes Lehr-und Arbeitsbuch. Springer-Verlag; 2008
- [101] Kohler U, Kreuter F. Datenanalyse mit Stata: allgemeine Konzepte der Datenanalyse und ihre praktische Anwendung. Walter de Gruyter GmbH & Co KG; 2016

- [102] Akremi L, Baur N, Fromm S, Hrsg. Datenanalyse mit SPSS für Fortgeschrittene 1: Datenaufbereitung und uni- und bivariate Statistik. Wiesbaden: VS Verlag für Sozialwissenschaften; 2011
- [103] Cleff T. Deskriptive Statistik und Explorative Datenanalyse. Aufl. Gabler, Wiesbaden 2015
- [104] Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Diabetologie und Stoffwechsel 2019; 14 (S 02): S111-S118. doi:10.1055/a-0898-7266
- [105] Bonetti G, Carta M, Montagnana M, et al. Effectiveness of citrate buffer-fluoride mixture in terumo tubes as an inhibitor of in vitro glycolysis. Biochemia Medica 2016; 26 (1): 68–76. doi:10.11613/BM.2016.006
- [106] van den Berg, S. A. A., Thelen MHM, Salden LPW, et al. It takes acid, rather than ice, to freeze glucose. SCIENTIFIC REPORTS 2015; 5. doi:10.1038/srep08875
- [107] Turchiano M, Nguyen C, Fierman A, et al. Impact of blood sample collection and processing methods on glucose levels in community outreach studies. Journal of Environmental and Public Health 2013; 2013. doi:10.1155/2013/256151
- [108] Field JB, Williams HE. Artfactual hypoglycemia associated with leukemia. New England Journal of Medicine 1961; 265 (19): 946–948
- [109] Bueding E, Goldfarb Walter. The effect of sodium fluoride and sodium idoacetate on glycolysis in human blood. J Biol Chem 1941; 14: 539–544
- [110] Schäfer-Graf UM. Diagnostics and Therapy of Gestational Diabetes. Guidelines of the Diabetes and Pregnancy Study Group of the DDG, 2001 (Replacing the 1992Guidelines). Geburtsh Frauenheilk 2004; 64 (2): 125–133. doi:10.1055/s-2003-43559
- [111] Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2002; 25 (4): 750–786. doi:10.2337/diacare.25.4.750
- [112] Roden M. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation und Diagnose. Wiener Klinische Wochenschrift 2007; 119 (15-16 Suppl 2): 5–64. doi:10.1007/s00508-007-0832-1
- [113] Qin J, Chai G, Brewer JM, et al. Fluoride inhibition of enolase: crystal structure and thermodynamics. Biochemistry 2006; 45 (3): 793–800. doi:10.1021/bi051558s
- [114] Gumińska M, Sterkowicz J. Effect of sodium fluoride on glycolysis in human erythrocytes and Ehrlich ascites tumour cells in vitro. Acta biochimica Polonica 1976; 23 (4): 285–291
- [115] Feig SA, Shohet SB, Nathan DG. Energy metabolism in human erythrocytes: I. Effects of sodium fluoride. The Journal of clinical investigation 1971; 50 (8): 1731–1737
- [116] Mikesch LM, Bruns DE. Stabilization of glucose in blood specimens: Mechanism of delay in fluoride inhibition of glycolysis. Clinical chemistry 2008; 54 (5): 930–932. doi:10.1373/clinchem.2007.102160
- [117] Chan AY, Swaminathan R, COCKRAM CS. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. Clinical chemistry 1989; 35 (2): 315–317

- [118] Roccaforte V, Daves M, Platzgummer S, et al. The impact of different sample matrices in delayed measurement of glucose. *Clin Biochem* 2016; 49 (18): 1412–1415. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.08.015
- [119] Juricic G, Bakliza A, Saracevic A, et al. Glucose is stable during prolonged storage in uncentrifuged Greiner tubes with liquid citrate buffer, but not in serum and NaF/KOx tubes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2016; 54 (3): 411–418. doi:10.1515/cclm-2015-0746
- [120] Souza MA, Ribeiro MZ., et. al. Effect of pH on the stability of hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. 2002 *Applied biochemistry and biotechnology*, 98(1-9), 265–272. <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:265>
- [121] Fobker M. Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2014; 52 (7): 1057–1060. doi:10.1515/cclm-2013-1049
- [122] del Pino IG, Constanso I, Mourín LV, et al. Citric/citrate buffer: an effective antiglycolytic agent. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2013; 51 (10): 1943–1949. doi:10.1515/cclm-2012-0735
- [123] Winter T, Greiser A, Nauck M, et al. Long-term stability of glucose: 96-h study using Terumo Glycaemia tubes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2016; 54 (3): 407–410. doi:10.1515/cclm-2015-0548
- [124] Koschinsky T, Luppä PB. „Neues und Kontroverses zur Blutglukosemessung bei der Diabetesdiagnostik: Konsequenzen der aktualisierten DDG- und AWMF-Leitlinien“/“Blood glucose measurement for the diagnosis of diabetes mellitus: new and controversial consequences of updated DDG and AWMF guidelines”. *Laboratoriumsmedizin* 2012; 36 (3). doi:10.1515/labmed-2011-0018
- [125] Hamann A, Müller-Wieland D, Palitzsch K-D, et al. Stellungnahme zum richtigen Gestationsdiabetes mellitus-Screening: STOP dem Einsatz von Blutentnahmeröhrchen, die nur NaF zur Glykolysehemmung enthalten!; 2014. URL: https://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Stellungnahmen/Stellungnahme_Glucosemessung_endgueltige_Version_revised_version_LH_2014_8_20.pdf
- [126] Norman M, Jones I. The shift from fluoride/oxalate to acid citrate/fluoride blood collection tubes for glucose testing - the impact upon patient results. *Clin Biochem* 2014; 47 (7-8): 683–685. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.01.011
- [127] Ridefelt P, Åkerfeldt T, Helmersson-Karlqvist J. Increased plasma glucose levels after change of recommendation from NaF to citrate blood collection tubes. *Clin Biochem* 2014; 47 (7-8): 625–628. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.02.022
- [128] Szoke D, Valente C, Panteghini M. Better blood collection tubes for plasma glucose: ready for prime time? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2014; 52 (5): e87-9. doi:10.1515/cclm-2013-1006
- [129] Bruns DE. Are fluoride-containing blood tubes still needed for glucose testing? *Clin Biochem* 2013; 46 (4-5): 289–290. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.01.009

- [130] Roth J, Müller N, Lehmann T, et al. Comparison of HbA1c measurements using 3 methods in 75 patients referred to one outpatient department. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2018; 126 (01): 23–26
- [131] Kerner W, Freckmann G, Müller U, et al. Positionspapier der Kommission für Labordiagnostik in der Diabetologie der DGKL und der DDG. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2015; 10 (06): 329–333. doi:10.1055/s-0041-109081
- [132] Leca V, Ibrahim Z, Lombard-Pontou E, et al. Point-of-care measurements of HbA(1c): simplicity does not mean laxity with controls. *Diabetes Care* 2012; 35 (12): e85. doi:10.2337/dc12-0751
- [133] Heinemann L, Freckmann G. Quality of HbA1c Measurement in the Practice: The German Perspective. *J Diabetes Sci Technol* 2015; 9 (3): 687–695. doi:10.1177/1932296815572254
- [134] Bundesärztekammer. Neufassung der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen – Rili-BÄK. *Dtsch Ärztebl* 2014; 111 (38): A1583-A1618
- [135] Kaiser P, Peetz D, Spannagl M. Qualitätssicherung in der Diabetologie. *Diabetologe* 2016; 12 (7): 494–497. doi:10.1007/s11428-016-0136-z
- [136] Pasqualetti S, Szöke D, Valente C, Panteghini M, Hrsg. Glycolysis inhibition and reliable plasma glucose results: is the clinical impact carefully considered? Bd. 53. de Gruyter; 2015
- [137] Gambino R, Bruns DE. Stabilization of glucose in blood samples: out with the old, in with the new. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2013; 51 (10): 1883–1885. doi:10.1515/cclm-2013-0341
- [138] Bruns DE, Knowler WC. Stabilization of Glucose in Blood Samples: Why It Matters. *Clinical chemistry* 2009; 55 (5): 850–852. doi:10.1373/clinchem.2009.126037
- [139] Gambino R. Sodium fluoride: an ineffective inhibitor of glycolysis. *Ann Clin Biochem* 2013; 50 (1): 3–5. doi:10.1258/acb.2012.012135
- [140] Juricic G, Kopcinovic LM, Saracevic A, et al. Liquid citrate acidification introduces significant glucose bias and leads to misclassification of patients with diabetes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2016; 54 (2): 363–371. doi:10.1515/cclm-2015-0358
- [141] Panteghini M. Implementation of standardization in clinical practice: not always an easy task. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2012; 50 (7): 1237–1241. doi:10.1515/CCLM.2011.791
- [142] HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *New England Journal of Medicine* 2008; 358 (19): 1991–2002. doi:10.1056/NEJMoa0707943
- [143] Kautzky-Willer A, Bancher-Todesca D, Pollak A, et al. Gestationsdiabetes (GDM). *Wiener Klinische Wochenschrift* 2012; 124 Suppl 2: 58–65. doi:10.1007/s00508-012-0265-3

- [144] Schäfer-Graf U. Bedeutung der HAPO-Ergebnisse für die zukünftige Diagnostik und Therapie des Gestationsdiabetes. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 2009; 49 (4): 254–258. doi:10.1159/000301083
- [145] Kautzky-Willer A, Bancher-Todesca D, Birnbacher R. Gestationsdiabetes (GDM). *Acta Medica Austriaca* 2004; 31 (5): 182–184
- [146] Deutsche Diabetesgesellschaft, Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Arbeitsgemeinschaft Geburtshilfe und Pränatalmedizin. S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 2. Auflage, Patientinnenleitlinie 2018. URL: https://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/2018/057-0081_S3_Gestationsdiabetes-mellitus-GDM-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2018-03.pdf
- [147] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33 Suppl 1: S62-9. doi:10.2337/dc10-S062.
- [148] Jeppsson, Jan-Olof, et al. "Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood." *Clinical chemistry and laboratory medicine* 40.1. 2002: 78-89. DOI: 10.1515/CCLM.2002.016
- [149] American Diabetes Association. "2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2019." *Diabetes Care* 42. Supplement 1. 2019: S13-S28. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>
- [150] World Health Organization. Classification of diabetes mellitus. Geneva; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Thesen

1. Zur exakten Abbildung der in vivo vorhandenen Blutzuckersituation und zur Diagnosestellung eines Diabetes mellitus ist die Vermeidung der Glykolyse im Entnahmegefäß nach der Blutentnahme eine notwendige Voraussetzung.
2. Die Geschwindigkeit des anaeroben Glukoseabbaus in einer Blutprobe variiert bei Lagerung unter Raumtemperatur und geht mit einem Glukosekonzentrationsabfall von etwa 5 - 7 % pro Stunde (ca. 0,6 mmol/l/h) einher.
3. Goldstandard der Glykolysehemmung ist die Zentrifugation der Vollblutprobe innerhalb von 15 Minuten nach der Blutentnahme in einer gekühlten Zentrifuge mit Trennung des Plasmaüberstands und Messung des Blutzuckers innerhalb von 24 Stunden aus dem venösen Plasma.
4. Erfolgt die rasche Probenbehandlung nicht nach der Goldstandardmethode, dann muss zur sofortigen ex vivo Glykolysehemmung die Azidifizierung des Blutes durch citratgepufferte Natriumfluoridröhrchen erfolgen.
5. Die Hemmung der Glykolyse durch Natriumfluorid-Additiv ohne Citrat ist innerhalb der ersten vier Stunden nach Blutentnahme unzureichend.
6. In citrathaltigen Probengefäßen werden höhere Glukosekonzentrationen gemessen. Die höher gemessenen Werte sind auf die Stabilisierung der Blutglukose zurückzuführen und nicht auf falsch hoch gemessene Werte.
7. Am untersuchten Kollektiv kann bei 53.046 Patienten im Mittel ein Anstieg der gemessenen Glukosekonzentration im Natriumfluorid/Citrat-Röhrchen um 14 % festgestellt werden.
8. Durch die Verwendung citrathaltiger Blutentnahmeröhrchen scheint die Diabetesprävalenz anzusteigen. Der Anteil der Patienten mit einem manifesten Diabetes mellitus hat bei Anwendung des Glukose-bezogenen Refrenzbereichs in der vorliegenden Studie um 19 % zugenommen.
9. Trotz erhöht gemessener Nüchternglukosekonzentration hat sich die HbA1c-Wertelage im Beobachtungszeitraum nur marginal verändert. Das Patientenkollektiv unterlag keiner verschlechterten Stoffwechselsituation nach den HbA1c-Diagnosekriterien.

10. Die HbA1c-Wertelage hat sich im Jahr der Glukose-Röhrchenumstellung zugunsten leicht niedriger gemessener Werte verändert, was auf mögliche therapeutische Interventionen durch die behandelnden Ärzte zurückzuführen ist. Diese hätten damit adäquat auf die erhöht gemessenen Glukosewerte reagiert.
11. In Natriumfluoridröhrchen ohne Citratzusatz werden nach den Blutzuckerbasierten-Kriterien 10 % weniger Diabetesdiagnosen gestellt als durch den parallel gemessenen HbA1c-Wert.
12. Nach Umstellung auf Blutentnahmegefäße mit Natriumfluorid-Citrat-Additiv werden in der vorgelegten Untersuchung nach den auf dem Blutzuckerwert beruhenden Entscheidungskriterien 12 % mehr mögliche Diabetiker identifiziert als durch den HbA1c-Wert.
13. Inwieweit die Bewertungsgrenzen für die Nüchternglukose für die Diabetesdiagnose unter Berücksichtigung der Einhaltung der optimalen präanalytischen Handhabung der Blutentnahmegefäße neu evaluiert werden müssen, wird in Fachkreisen kontrovers diskutiert.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die hier vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Wolfsburg, 09.01.2020

Saskia Sharma

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Peter Schuff-Werner für seine kompetente und engagierte Betreuung, und seine wertvollen Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Darius Ališauskas aus dem MVZ der Medizinisch Diagnostischen Institute Limbach Berlin möchte ich für die Hilfe bei der Datenerhebung danken.

Für die statistische Beratung und fachliche Hilfestellung geht mein Dank an Herrn Prof. Dr.-Ing. Günther Kundt und Herrn Vincent Stoliaroff.

Meiner Freundin Anna danke ich für ihre geistigen Anregungen und moralische Unterstützung.

Meinen Eltern, meinen Großeltern und meinem Bruder danke ich von ganzem Herzen für ihren unermüdlichen Glauben an mich während der gesamten Studien- und Dissertationszeit.

Ganz besonders herzlich danke ich meinem Mann Gaurav für seinen anhaltenden Zuspruch und seine stets verständnisvolle und tatkräftige Unterstützung.

Anhang



Universitätsmedizin
Rostock

Universitätsmedizin Rostock · PF 10 08 88 · 18055 Rostock

Prof. Dr. med. P. Schuff-Werner
Schillerstraße 16
18055 Rostock

Ethikkommission an der
Medizinischen Fakultät der
Universität Rostock

Vorsitzender:
Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Büttner
andreas.buettner@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9900

Geschäftsstellenleiterin:
Swantje Kohlschein
kautz@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9904

Geschäftsstelle:
ethik@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9939
Fax: +49 381 494-9902
Homepage:
www.ethik.med.uni-rostock.de

Stellungnahme der Ethikkommission

10.10.2016

Titel der Studie: Retrospektive Analyse von Glukosemesswerten von Patienten vor und nach Einführung eines neuen Blutentnahmesystems mit Zusatz von Citrat/NaF zur effektiven Glukosehemmung

Studienleiter vor Ort: Prof. Dr. med. P. Schuff Werner
Schillerstraße 16
18055 Rostock

Registriernummer: (Bei Schriftwechsel bitte stets angeben) **A 2016-0179**
Eingang Ethikkommission: 28.09.2016

Sehr geehrter Herr Professor Schuff-Werner,

der Vorsitzende der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock hat die von Ihnen eingereichten Unterlagen im Auftrag der Kommission geprüft. Die Unterlagen liegen der Kommission vollständig vor.

Es bestehen aus **berufsrechtlicher und ethischer Sicht keine Bedenken** gegen die Durchführung des o.g. Forschungsprojekts.

Wir weisen Sie darauf hin, dass die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters des Projektes und der teilnehmenden Ärzte entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission von dieser Stellungnahme unberührt bleibt.

Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Allgemeine Hinweise:

1. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser klinischen Prüfung verbleibt beim Sponsor, bei der Leiterin/dem Leiter der klinischen Prüfung und bei den Prüferinnen/Prüfern.
2. Zusammensetzung und Arbeitsweise der Ethik-Kommission entsprechen nationalen Gesetzen, Vorschriften und der ICH-GCP-Leitlinie in der jeweils gültigen Fassung.

Mit freundlichen Grüßen

Univ.-Prof. Dr. med. A. Büttner
Vorsitzender der Ethikkommission

Frank Stölken
Geschäftsstelle

Anlage:
Mitgliederliste der Ethikkommission